

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年1 月10 日 (10.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/03070 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/566, 33/50, 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05809
- (22) 国際出願日: 2001 年7 月4 日 (04.07.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-208254 2000 年7 月5 日 (05.07.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 正明 (MORI, Masaaki) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日3丁
- 目8番地5 Ibaraki (JP). 下村行生 (SHIMOMURA, Yukio) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地1-410号 Ibaraki (JP). 原田美穂子 (HARADA, Mioko) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東2丁目14番地5-201号 Ibaraki (JP). 周郷 司 (SUGO, Tsukasa) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県つくば市花畑2丁目7番地26-301号 Ibaraki (JP). 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-703号 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING MCH RECEPTOR ANTAGONIST/AGONIST

(54) 発明の名称: MCH受容体アンタゴニスト・アゴニストのスクリーニング方法

(57) Abstract: A method for screening compounds or salts thereof which change the affinity of MCH or a salt thereof with SLT or a salt thereof, or its peptide fragment or its amide or its ester or its salt, characterized in that it comprises using MCH or a derivative thereof or its salt, and SLT or a salt thereof or its peptide fragment or its amide or its ester or its salt. The method is useful as a method for screening SLT agonists which can be used as an appetite stimulating agent and the like, and SLT antagonists which can be used as a preventive/ therapeutic agent for obesity and the like.

(57) 要約:

本発明は、MCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などに関する。

本発明のスクリーニング方法は、食欲 (摂食) 増進剤などとして用いることができるSLTアゴニスト、および肥満症などの予防・治療薬などとして用いることができるSLTアンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。



WO 02/03070 A1



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## MCH受容体アンタゴニスト・アゴニストのスクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、オーファンレセプター蛋白質である配列番号：3で表されるタンパク質（WO 00/49046（PCT/J P 0 0 / 0 0 9 2 7号））またはその塩とMCH（メラニン凝集ホルモン；Melanin Concentrating Hormone（Endocrinology, vol.125, 1660-1665（1989）など）もしくはその誘導体またはその塩を用いることを特徴とする抗肥満薬または食欲調整薬などのスクリーニング方法などに関する。

## 背景技術

生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的な受容体を介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節に与るホルモンや神経伝達物質の受容体の多くはguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）と共役しており、このG蛋白質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらの受容体タンパク質は共通して7個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうした受容体はG蛋白質共役型受容体あるいは7回膜貫通型受容体と総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質およびそれに対する受容体蛋白質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質（ホルモンや神経伝達物質など）およびそれに対する受容体が存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。

近年、ヒトゲノム DNA あるいは各種ヒト組織由来の cDNA のランダムな配列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知の蛋白をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。G 蛋白質共役型受容体は、7 個の膜貫通領域を有するのみでなくその核酸あるいはアミノ酸に多くの共通配列が存在するためそのような蛋白の中から明確に G 蛋白質共役型受容体として区分することができる。一方でこうした構造の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCR と略称する) 法によってもこうした G 蛋白質共役型受容体遺伝子が得られている。このようにしてこれまでに得られた G 蛋白質共役型受容体のうちには既知の受容体との構造の相同性が高いサブタイプであって容易にそのリガンドを予測することが可能な場合もあるが、ほとんどの場合その内在性リガンドは予測不能であり、これらの受容体は対応するリガンドが見いだされていない。このことからこれらの受容体はオーファン受容体と呼ばれている。このようなオーファン受容体の未同定の内因性リガンドは、リガンドが知られていなかったために十分な解析がなされていなかった生物現象に関与している可能性がある。そして、このようなりガンドが重要な生理作用や病態と関連している場合には、その受容体作動薬あるいは拮抗薬の開発が革新的な医薬品の創製に結びつくことが期待される (Stadel, J. et al., TIPS, 18 巻、430-437 頁、1997 年、Marchese, A. et al., TIPS, 20 巻、370-375 頁、1999 年、Civelli, O. et al., Brain Res., 848 巻、63-65 頁、1999 年)。しかし、これまで実際にオーファン G 蛋白質共役型受容体のリガンドを同定した例はそれほど多くない。

最近、幾つかのグループによってこうしたオーファン受容体のリガンド探索の試みがなされ、新たな生理活性ペプチドであるリガンドの単離・構造決定が報告されている。Reinsheid らおよび Meunier らは独立に、動物細胞にオーファン G 蛋白質共役型受容体 LC132 あるいは ORL1 をコードする cDNA を導入して受容体を発現させ、その応答を指標として orphanin FQ あるいは nociceptin と名付けられた新規ペプチドをブタ脳あるいはラット脳の抽出物

より単離し、配列を決定した (Reinscheid, R. K. et al., Science, 270 巻、792-794 頁、1995 年、Meunier, J.-C. et al., Nature, 377 巻、532-535 頁、1995 年)。このペプチドは痛覚に関与していることが報告されたが、さらに、受容体のノックアウトマウスの研究により記憶に関与していることが明らか

5 にされた (Manabe, T. et al., Nature, 394 巻、577-581 頁、1998 年)。

その後これまでに上記と同様な方法により PrRP (prolactin releasing peptide)、orexin、apelin、ghrelin および GALP (galanin-like peptide) などの新規ペプチドがオーファン G 蛋白質共役型受容体のリガンドとして単離された (Hinuma, S. et al., Nature, 393 巻、272-276 頁、1998 年、Sakurai, T. et al., Cell, 92 巻、573-585 頁、1998 年、Tatemoto, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 251 巻、471-476 頁、1998 年、Kojima, M. et al., Nature, 402 巻、656-660 頁、1999 年、Ohtaki, T. et al., J. Biol. Chem., 274 巻、37041-37045 頁、1999 年)。

10

一方、これまで明らかでなかった生理活性ペプチドの受容体が同様な方法

15 によって解明される場合もある。腸管収縮に関与する motilin の受容体が GPR38 であることが明らかにされた (Feighner, S. D. et al., Science, 284 巻、2184-2188 頁、1999 年) ほか、SLC-1 がメラニン凝集ホルモン (MCH) の受容体として同定され (Chambers, J. et al., Nature, 400 巻、261-265 頁、1999 年、Saito, Y. et al., Nature, 400 巻、265-269 頁、1999 年、Shimomura, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 261 巻、622-626 頁、1999 年、Lembo, P. M. C. et al., Nature Cell Biol., 1 巻、267-271 頁、1999 年、Bachner, D. et al., FEBS Lett., 457 巻、522-524 頁、1999 年)、また GPR14 (SENR) が urotensin II の受容体であることが報告された (Ames, R. S. et al., Nature, 401 巻、282-286 頁、1999 年、Mori, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 265 巻、123-129 頁、1999 年、Nothacker, H.-P. et al., Nature Cell Biol., 1 巻、383-385 頁、1999 年、Liu, Q. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 266 巻、174-178 頁、1999 年)。MCH はそのノックアウトマウスが羸瘦の phenotype を示すことから肥満に関与することが示されていたが

20

25 (Shimada, M. et al., Nature, 396 巻、670-674 頁、1998 年)、その受容体

が明らかにされたことにより抗肥満薬としての可能性を有する受容体拮抗薬の探索が可能となった。また、urotensin II はサルに静脈内投与することによって心虚血を惹起することから心循環系に強力な作用を示すことも報告されている (Ames, R. S. et al., Nature, 401 巻、282-286 頁、1999 年)。

5        このように、オーファン受容体およびそのリガンドは新たな生理作用に関与する場合が多く、その解明は新たな医薬品開発に結びつくことが期待される。しかし、オーファン受容体のリガンド探索においては多くの困難さが伴い、これまでに数多くのオーファン受容体の存在が明らかにされながらそのリガンドが明らかにされた受容体はごく一部に過ぎない。

10        オーファン G 蛋白質共役型受容体として渡辺らは新規受容体 S L T (本願明細書の配列番号: 3 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質: 以下、本明細書において、単に S L T と称する場合がある) を見出した (W O 00/49046 (P C T / J P / 0 0 9 2 7 号)) が、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。

15

#### 発明の開示

本発明者らは、S L T 受容体蛋白を高発現する CHO 細胞を作製し、種々の動物組織抽出物あるいは既知ペプチドを投与して受容体発現細胞の応答を検討した。その結果、予想外にも、MCH が S L T 受容体発現 CHO 細胞に対して細胞内 cAMP 産生抑制活性を示すことを見出した。このことは、MCH が S L T

20        の内因性リガンドであることを示すものである。

本発明者らは、かかる知見に基づいて、MCH および S L T を用いたスクリーニング系を用いて、より好ましくは、更に MCH および S L C - 1 を用いたスクリーニング系と組み合わせることによって、MCH の介在する疾患

25        の治療薬 (MCH 拮抗薬あるいは作動薬など、具体的には抗肥満薬など) のスクリーニングができることを初めて見出した。

すなわち、本発明は、

(1) メラニン凝集ホルモン (MCH) もしくはその誘導体またはその塩および配列番号: 3 で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプ

チドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩と配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニン

5   グ方法、

(2) さらにSLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記

(1) 記載のスクリーニング方法、

10   (3) MCHもしくはその誘導体またはその塩および配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とするMCHまたはその塩と配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

15   (4) さらにSLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする上記(3) 記載のスクリーニング用キット、

20   (5) 上記(1) 記載のスクリーニング方法または上記(3) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、MCHまたはその塩と配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(6) 上記(5) 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(7) 抗肥満薬である上記(6) 記載の医薬、

25   (8) MCHが配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである上記(1) 記載のスクリーニング方法、

(9) MCHが配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである上記(3) 記載のスクリー

ニング用キット、

(10) 誘導体が配列番号：6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである上記(1)記載のスクリーニング方法、

- 5 (11) 誘導体が配列番号：6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである上記(3)記載のスクリーニング用キット、

- 10 (12) 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである上記(1)記載のスクリーニング方法、

- 15 (13) 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号：6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである上記(3)記載のスクリーニング用キット、

(14) MCHもしくはその誘導体またはその塩が [ $^{125}$ I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)またはその塩である上記(1)記載のスクリーニング方法、

- 20 (15) MCHもしくはその誘導体またはその塩が [ $^{125}$ I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)またはその塩である上記(3)記載のスクリーニング用キット、

- 25 (16) ①MCHもしくはその誘導体またはその塩；②SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および③配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、

1) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、

2) (i) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその



アミドもしくはそのエステルまたはその塩；および／または

(ii) 配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5 (17) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法、

- 10 (18) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法、

- 15 (19) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、(i) 配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および(ii) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする上記(16)記載のスクリーニング方法、

- 20 (20) ①MCHもしくはその誘導体またはその塩；②SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および③配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする、

- 25 1) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、  
2) (i) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および／または  
(ii) 配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性

を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、などを提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

- 5 図 1 は、ヒト海馬由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 hSLT をコードする DNA の塩基配列、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す。
- 図 2 は、種々の濃度の MCH のヒト SLT 発現 CHO 細胞に対する cAMP 合成抑制活性を示す図を示す。
- 図 3 は、ボルトン-ハンター試薬を用いて作製した [<sup>125</sup>I]-標識 MCH(4-19) のヒト SLT 発現 CHO 細胞から調製した細胞膜画分に対する特異的結合を示す図を示す。3 種類の発現細胞のクローン (#1, 26, 36) の膜画分について測定した。
- 10 図 4 は、ヒト SLT 発現 CHO 細胞から調製した細胞膜画分を用いた、ボルトン-ハンター試薬を用いて作製した [<sup>125</sup>I]-標識 MCH(4-19) に対する MCH およびそのアミノ末端短縮体である MCH(4-19) の結合阻害活性を示す図を示す。
- 15 図 5 は、FLIPR を用いて測定した種々の濃度の MCH のヒト SLT 発現 CHO 細胞に対する細胞内 Ca イオン上昇活性を示す図を示す。
- 図 6 は、種々の濃度の MCH が示すヒト SLT 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を示す図を示す。

20

本明細書において、「実質的に同一」とはポリペプチドなどの活性、例えば、リガンド (MCH) と受容体 (SLT) の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。

- 25 本発明で用いられる SLT またはその塩 (以下、単に SLT と略称する場合がある) および MCH もしくはその誘導体またはその塩 (以下、単に MCH と略称する場合がある) の製造法を以下にさらに詳細に説明する。

また、本発明の SLT と MCH を用いることを特徴とするスクリーニング方法などと組み合わせて用いることができる MCH の受容体 SLC-1 またはその塩 (以下、単に SLC-1 と略称する場合がある) は、例えば、Chambers,

J. et al., Nature, 400 巻、261-265 頁、1999 年、Saito, Y. et al., Nature, 400 巻、265-269 頁、1999 年、Shimomura, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 261 巻、622-626 頁、1999 年、Lembo, P. M. C. et al., Nature Cell Biol., 1 巻、267-271 頁、1999 年、Bachner, D. et al., FEBS Lett., 457 5 巻、522-524 頁、1999 年、および WO 00/40725 (PCT/JP99/07336 号) に記載の製造法によって得ることができるが、SLC-1 の製造法についても、以下に合わせて説明する。

本発明で用いられる SLT、SLC-1 および MCH としては、ヒト、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル  
10 など）および魚類などのあらゆる組織（たとえば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、SLT としては、配列番号：3、SLC-1 としては、配列番号：16 または配列番号：17、MCH としては配列番号：6 で表わされるアミノ酸配列と同一も  
15 しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。例えば、SLT としては、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガ  
20 ンド結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なっているともよい。SLC-1 としては、配列番号：16 または配列番号：17 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：  
25 16 または配列番号：17 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達活性などがあげられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチ

ドの分子量などの量的要素は異なってもよい。MCHとしては、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性などがあげられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

10 本明細書におけるSLT、SLC-1およびMCHはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。例えば、配列番号：3、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：6で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのR  
15 としては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキルなどのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明で用いられるSLT、SLC-1およびMCHの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）  
25 との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるSLT、SLC-1およびMCHは、公知の方法（例、FEBS Letters 398 (1996) 253-258、WO 96/18651号記載の方法）に準じた方法、即ち、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のタンパク質（ペプチド）合成法  
5 に準じて製造することもできる。また、後述するタンパク質（ペプチド）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ヒト、温血動物、魚類などの組織または細胞から製造する場合、ヒト、温血動物、魚類などの組織または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒など  
10 どで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

上記したように本発明で用いられるSLT、SLC-1およびMCHは、  
15 自体公知のタンパク質（ペプチド）の合成法に従って、あるいはSLT、SLC-1および/またはMCHを含有するタンパク質（ペプチド）を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。タンパク質（ペプチド）の合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、SLT、SLC-1および/またはMCHを構成し得  
20 る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のタンパク質（ペプチド）を製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

- ① M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide  
25 Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)
- ② Schroeder および Luecke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)
- ③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)
- ④ 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、

(1977 年)

⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第 14 巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせてタンパク質（ペプチド）を精製単離することができる。上記方法で得られるタンパク質（ペプチド）が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

SLT、SLC-1 および MCH のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質（ペプチド）を切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質（ペプチド）を取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、タンパク質（ペプチド）合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどがあげられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOOBT など）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対

称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBT エステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質（ペプチド）縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜  
5 選択されうる。たとえば N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセト  
10 ニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約  $-20^{\circ}\text{C}$  ~  $50^{\circ}\text{C}$  の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常 1.5 ないし 4 倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反  
15 応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

20

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルス  
25 ルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmoc などがあげられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえば R として上記した  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、 $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、 $\text{C}_{7-14}$  アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカ

ルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどがあげられる。

- セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、
- 5   ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などがあげられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえば Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-7、ターシャリーブチルなどがあげられる。

- 10   ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmoc などがあげられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェ
- 15   ノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBT) とのエステル] などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドがあげられる。

- 20   保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえば Pd 黒あるいは Pd 炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アン
- 25   モニア中ナトリウムによる還元などもあげられる。上記酸処理による脱離反応は一般に -20℃ ~ 40℃ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護



基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

SLT、SLC-1およびMCHのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質（ペプチド）を得ることができる。この粗タンパク質（ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質（ペプチド）のアミド体を得ることができる。

SLT、SLC-1およびMCHのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質（ペプチド）のアミド体と同様にして所望のタンパク質（ペプチド）のエステル体を得ることができる。

本発明で用いられるMCHの誘導体としては、①MCHの部分ペプチド、②MCHの構成アミノ酸が欠失したペプチド、構成アミノ酸に他のアミノ酸が付加したペプチド、構成アミノ酸が他のアミノ酸に置換されたペプチド、または③MCH、上記①記載の部分ペプチドまたは②に記載のペプチドが標識化されたものなど、好ましくは、SLTおよびSLC-1との結合能を有するものであれば何れのものであってもよい。

MCHの部分ペプチドとして具体的には、配列番号：6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の部分配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などがあげられる。より具体的には、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14または配列番号：15で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などがあげられる。

さらに、SLTおよび/またはSLC-1を用いて後述のスクリーニングを行う場合に、特に好ましくは配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩が好ましく用いられる。

また、MCHの構成アミノ酸が欠失したペプチド、構成アミノ酸に他のアミノ酸が付加したペプチド、構成アミノ酸が他のアミノ酸に置換されたペプチドとしては、配列番号：6中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたペプチドなどがあげられる。

該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどがあげられる。極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどがあげられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどがあげられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アス

パラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

但し、上記する他のアミノ酸が欠失、置換する位置としては、MCHの構成アミノ酸中、Cys以外の位置であることが好ましい。

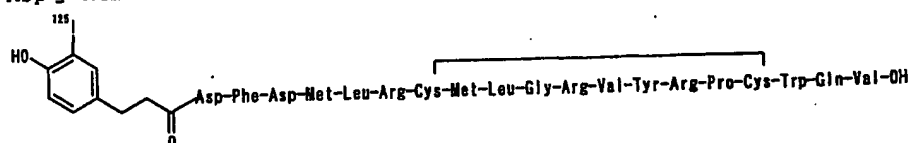
MCH、上記①記載のペプチドまたは②に記載のペプチドが標識化されたものとしては、自体公知の方法で、アイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたもの、酵素標識されたものなどがあげられる。

具体的には、例えば公知の方法によって、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたMCHなどを利用することができる。また、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製したMCHまたはその誘導体の標識体を利用することもできる。

該MCHまたはその誘導体の標識体の具体例としては、例えば、

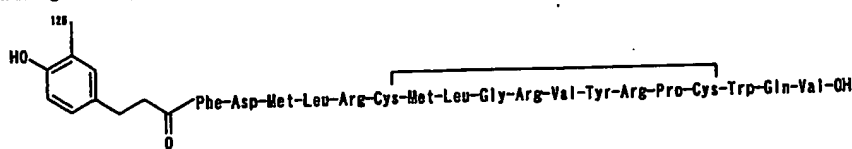
(1)  $[^{125}\text{I}]$  - [N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-

Asp<sup>1</sup>]-MCH



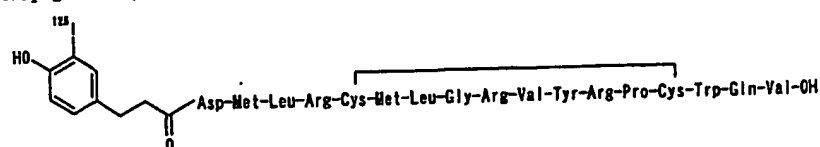
(2)  $[^{125}\text{I}]$  - [N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-

Phe<sup>2</sup>]-MCH(2-19)



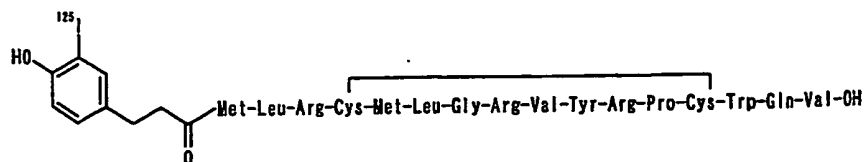
(3)  $[^{125}\text{I}]$  - [N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-

Asp<sup>3</sup>]-MCH(3-19)

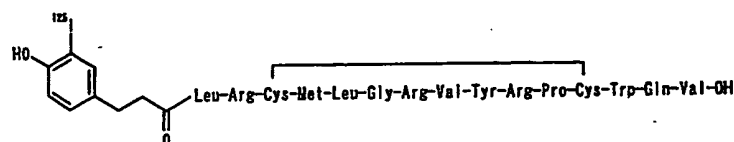


(4)  $[^{125}\text{I}]$  - [N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-

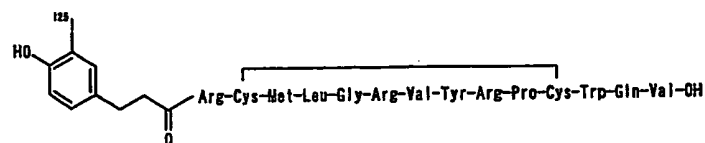
Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)



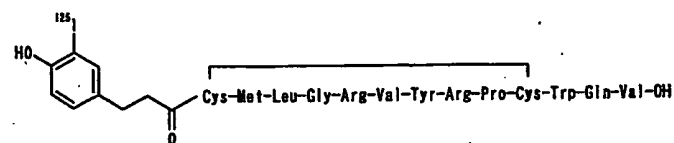
(5) [<sup>125</sup>I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-  
Leu<sup>5</sup>]-MCH(5-19)



5 (6) [<sup>125</sup>I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-  
Arg<sup>6</sup>]-MCH(6-19)



(7) [<sup>125</sup>I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-  
Cys<sup>7</sup>]-MCH(7-19)



10

などがあげられる。

なかでも、特に [<sup>125</sup>I] -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオ  
ニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)が好ましく用いられる。

MCHもしくはその誘導体の塩としては、上記のSLT、SLC-1およ  
15 びMCHの塩と同様のものなどがあげられる。

本発明で用いられるSLTおよび/またはSLC-1の部分ペプチド(以  
下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、前記したSLTおよび  
/またはSLC-1を構成する部分ペプチドであれば何れのものであっても  
よいが、例えば、SLTおよび/またはSLC-1の蛋白質分子のうち、細  
20 胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものな  
どが用いられる。

具体的には、SLTおよび/またはSLC-1の疎水性プロット解析にお

いて細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

- 5     SLTおよび／またはSLC-1の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記したSLTおよび／またはSLC-1の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上である。

- また、SLTおよび／またはSLC-1の部分ペプチドとしては、上記SLTおよび／またはSLC-1を表わすアミノ酸配列中の1または2個以上  
10     （好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～  
15     5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたペプチドなどもあげられる。

以下、SLTおよびSLTの部分ペプチドを単にSLTと、SLC-1およびSLC-1の部分ペプチドを単にSLC-1と略称する場合がある。

- 本発明で用いられるSLTをコードするDNAとしては、配列番号：3で  
20     表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、本発明で用いられるSLC-1をコードするDNAとしては、配列番号：16または配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDN  
25     Aを含有するDNA、本発明で用いられるMCHをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した組織・細胞由来のcDNA、前記した

組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase

- 5 Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

- より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で、配列番号：3、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNA、(2)遺伝コードの縮重のため、配列番号：3、配列番号：16、配列番号：17または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつタンパク質またはペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1% SDSである。
- 10  
15  
20

- 本発明で用いられるSLTをコードするDNA、即ち、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとしてより具体的には、配列番号：9で表わされる塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。
- 25

本発明で用いられるSLC-1をコードするDNA、即ち、配列番号：16または配列番号：17で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする塩基配列を有するD

NAを含有するDNAとしてより具体的には、配列番号：18または配列番号：19で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

- 5 本発明で用いられるMCHをコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

本発明で用いられるSLT、SLC-1およびMCHをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

- 10 本発明のSLT、SLC-1またはMCHを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のSLT、SLC-1またはMCHの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばSLT、SLC-1またはMC  
15 Hをコードする塩基配列の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使  
20 用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

- クローン化された本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその  
5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻  
25 訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHの発現ベクターは、

例えば、(イ) 本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- 5      ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。
- 10    用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

- 形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$
- 15    プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、T<sub>7</sub>プロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、pen
- 20    Pプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

- 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、
- 25    ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐



性)等があげられる。特に、CHO (dhfr<sup>-</sup>)細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター $\alpha$  (MF $\alpha$ )・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440 (1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)]などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R<sup>-</sup>, NA 8 7-1 1 A, DKD-5 D, 2 0 B-1 2 などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; S f 細胞)、*Trichoplusia ni* の中腸由来の M G 1 細胞、*Trichoplusia ni* の卵由来の High Five<sup>TM</sup> 細胞、*Mamestra brassicae* 由来の細胞または *Estigmena acrea* 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞〔以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 1 3 巻, 2 1 3-2 1 7 頁 (1 9 7 7 年)〕などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサル COS-7 細胞、V ero 細胞、チャイニーズハムスター細胞 CHO, DHFR 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (d h f r<sup>-</sup> CHO 細胞)、マウス L 細胞、マウス 3 T 3 細胞、マウスミエローマ細胞、ヒト HEK 2 9 3 細胞、ヒト FL 細胞、2 9 3 細胞、C 1 2 7 細胞、BALB 3 T 3 細胞、S p-2/O 細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 6 9 巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) や ジーン (Gene), 1 7 巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なわれる。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 1 6 8 巻, 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc.

Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6巻, 47-55頁(1988年)などに記載の方法に

5 従って行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Felgner, P.L. et al. プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America), 84巻, 7413頁(1987年)]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁(1973年)]、電気穿孔法 [Niemann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 841-845頁(1982年)]等があげられる。

15 このようにして、本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しくローン選択を行なうことにより本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHの高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができる。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

上記の形質転換体を本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHをコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを生成、蓄積せしめることによって、本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを製造することができる。

5 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液など、  
10 無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働か  
20 せるために、たとえば3-β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

25 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばパークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、"プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1

980)) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] があげられる。培地のpHは約5~8に調整するの  
5 が好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培  
10 地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8  
15 巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of The American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of The Society for The Biological Medicine), 73巻,  
20 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培  
25 地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集

め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク変性剤や、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中に本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、タンパク質（ペプチド）を部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、

アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。またN末端アミノ酸を欠失させるためには、エドマン(Edman)試薬(フェニルイソチオシアネート)を用いた公知のエドマン法を用いることが可能である。

- 5      かくして生成する本発明で用いられるSLT、SLC-1またはMCHの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 10      MCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLTまたはその塩を用いることを特徴とするMCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法またはMCHもしくはその標識体またはその塩およびSLTまたはその塩を含有することを特徴とするMCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット(以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する)について以下に詳述する。
- 15      。

- 20      SLTまたはその塩を用いるか、または組換え型SLTの発現系を構築し、該発現系を用いたMCHもしくはその誘導体またはその塩との結合アッセイ系(リガンド・レセプターアッセイ系)を用いることによって、MCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。

- 25      このような化合物には、SLTを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(即ちSLT(MCH受容体)アゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ちSLT(MCH受容体)アンタゴニスト)などが含まれる。「MCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を变化させる」とは、MCHまたはその塩とSLTまたはその

塩との結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

- すなわち、本発明は、(i) S L Tまたはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩を接触させた場合と (ii) 上記した S L Tまたはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするMCHまたはその塩とS L Tまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記した S L Tまたはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩を接触させた場合と (ii) 上記した S L Tまたはその塩に、MCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば該 S L Tまたはその塩に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

- 15 本発明のスクリーニング方法は具体的には、

- ①標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩（「MCHの誘導体またはその塩」として、上記の「MCH等が標識化されたものまたはその塩」を用いる場合には、更に標識する必要はない。以下同じ。）を、上記した S L Tまたはその塩に接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を S L Tまたはその塩に接触させた場合における、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩の該 S L Tまたはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩と S L Tまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 25 ②標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩を、 S L Tを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物を S L Tを含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較すること



を特徴とするMCHまたはその塩とSLTとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ③標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩を、SLTをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLTに接触させた場合と、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩および試験化合物をSLTをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLTに接触させた場合における、標識したMCHもしくはその誘導体またはその塩のSLTに対する結合量を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLTとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ④SLTを活性化する化合物（例えば、MCHもしくはその誘導体またはその塩）をSLTを含有する細胞に接触させた場合と、SLTを活性化する化合物および試験化合物をSLTを含有する細胞に接触させた場合における、SLTを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLTとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤SLTを活性化する化合物（例えば、MCHもしくはその誘導体またはその塩など）をSLTをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLTに接触させた場合と、SLTを活性化する化合物および試験化合物を、SLTをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSLTに接触させた場合における、SLTを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするMCHまたはその塩とSLTとの

結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるSLTとしては、上記のSL  
5 Tを含有するものであれば何れのものであってもよい。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたSLTなどが適している。

SLTを製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、SLTを含有する細胞あるいは該  
10 細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

SLTを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

SLTを含有する細胞としては、SLTを発現した宿主細胞をいうが、該  
15 宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-  
Elvehjem 型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーや  
20 ポリトロン (Kinematica 社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠  
25 心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したSLTと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該SLTを含有する細胞や膜画分中のSLTの量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。な

お、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

5 MCHまたはその塩とSLTとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なSLT画分と、標識したリガンドまたはリガンド活性を有する化合物（MCHもしくはその誘導体）が用いられる。SLT画分としては、天然型のSLT画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型SLT画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドまたはリガ  
10 ンド活性を有する化合物としては、標識したリガンドまたはリガンド活性を有する化合物（MCHまたはその誘導体）などが用いられる。例えば [ $^3\text{H}$ ]、 [ $^{125}\text{I}$ ]、 [ $^{14}\text{C}$ ]、 [ $^{35}\text{S}$ ] などで標識されたりガンド（MCHまたはその誘導体）などを利用することができる。特に、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製したMCHの誘導体の標識体を利用することもで  
15 きる。

MCH誘導体の標識体の具体例としては、例えば、上記の（１）～（７）で表される化合物などがあげられる。

具体的には、MCHまたはその塩とSLTとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずSLTを含有する細胞または細胞の膜画  
20 分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーは、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加え  
25 することもできる。さらに、プロテアーゼによるSLTやMCHもしくはその誘導体の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm

～500000 cpm) の標識したMCHもしくはその誘導体を添加し、同時に $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のMCHもしくはその誘導体を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で  
5 20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、反応液をガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは $\gamma$ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント( $B_0$ )から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント( $B_0 - \text{NSB}$ )を100%とした時、特異的結合量( $B - \text{NSB}$ )が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

また、SLTとMCHもしくはその誘導体との結合を測定する方法として、BIAcore (アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いることもできる。この方法では、MCHもしくはその誘導体を装置に添付のプロトコルに従ったアミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、SLT  
15 を含有する細胞またはSLTをコードするDNAを含有する形質変換体から精製したSLTまたはSLTを含む膜画分、あるいは精製したSLTまたはSLTを含む膜画分および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を毎分2～20  $\mu\text{l}$ の流量で通過させる。センサーチップ上のMCHもしくはその誘導体とSLTとが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによってSLTとMCHとの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、SLTをセンサーチップに固定し、MCHもしくはその誘導体またはMCHもしくはその  
25 の誘導体および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

MCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、SLTを介

する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、SLTを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なSLTを発現した細胞が用いられる。SLTを発現した細胞としては、前述の組換え型SLT発現細胞株などが望ましい。形質転換体であるSLT発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

上記のリガンド・レセプターアッセイ系について、さらに具体的に記載すると以下のようなアッセイ系が用いられる。

(1) 受容体発現細胞が受容体アゴニストによって刺激されると細胞内のGタンパクが活性化されてGTPが結合する。この現象は受容体発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTP $\gamma$ Sを添加しておくとGTP $\gamma$ SはGT

Pと同様にGタンパクに結合するが、加水分解されずにGタンパクを含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP  $\gamma$  Sを用いると細胞膜に残存した放射活性を測定することによって受容体アゴニストの受容体発現細胞刺激活性を測定することができる。この反応を利用してMCHもしくはその誘導体のSLT発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。この方法は、前記④～⑤のようにSLTを含む細胞を用いるものではなく、①～③のようにSLTを含む膜画分を用いるアッセイ法であるが、④～⑤のように細胞刺激活性を測定するものであり、本測定法においてSLT膜画分へのGTP  $\gamma$  S結合促進活性を示す物質はアゴニストである。ここにおいて、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加し、MCHもしくはその誘導体の単独投与に比べてSLT細胞膜画分へのGTP  $\gamma$  S結合促進活性に変化が生じることを観察することによってMCHとSLTとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。このとき、MCHもしくはその誘導体によるSLT細胞膜画分へのGTP  $\gamma$  S結合促進活性を抑制する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、SLT細胞膜画分へのGTP  $\gamma$  S結合促進活性を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。SLTを含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1  $\mu$  M GDP, 0.1% BSA pH 7.4）で希釈する。希釈率は、受容体の発現量により異なる。これをFalcon2053に0.2mlずつ分注し、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、さらに終濃度200 pMとなるように[<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  Sを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液（50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS pH 7.4 1.5ml）を加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した[<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  Sの放射活性を測定する。MCHもしくはその誘導体のみを加えた実験区の放射活性を100%、MCHもしくはその誘導体を加え

なかった実験区の放射活性を0%とし、MCHもしくはその誘導体によるGTP $\gamma$ S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP $\gamma$ S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

5

(2) SLT発現細胞はMCH刺激によって細胞内cAMP量が減少する。この反応を利用してMCHのSLT発現細胞に対する刺激活性を測定することができる。

SLTを発現させた種々の動物細胞のcAMP産生量はマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と<sup>125</sup>I標識cAMP（ともに市販品）を使用することによってRIAあるいは抗cAMP抗体と標識cAMPとを組み合わせた他のEIA系でも測定することができる。また抗cAMP抗体をprotein Aあるいは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと<sup>125</sup>I標識cAMPとを使用するSPA法による定量も可能である（アマシャムファルマシアバイオテック製のキットを使用する）。

cAMP産生抑制のアッセイは、具体的には後述の実施例5またはそれに準じた方法により行われる。この系において、フォルスコリンまたはcalcitoninなど細胞内cAMP量を増加させるようリガンドなどによって細胞内cAMP量を上昇させ、MCHもしくはその誘導体またはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加することによってMCHもしくはその誘導体の単独投与による細胞内cAMP量の抑制が変化することを観察し、MCHとSLTの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、MCHもしくはその誘導体によるSLT発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを添加してcAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

25

スクリーニング法をより具体的に以下に記載する。CHO/SLT細胞を24穴プレートに $5 \times 10^4$  cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-

イソブチルメチルキサンチンと 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハックスバッファー (pH7.4) で洗浄する (以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハックスバッファー (pH7.4) を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後 0.5ml の反応用バッファーを加えて 30 分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新たに 0.25ml の反応用バッファーを細胞に加えた後、2  $\mu$ M フォルスコリンを含む 0.25ml の反応用バッファーに 1 nM の MCH もしくはその誘導体あるいは 1 nM の MCH もしくはその誘導体および試験化合物を添加したものを細胞に加え、37°C で 24 分間反応させる。100  $\mu$ l の 20% 過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で 1 時間置くことにより細胞内 cAMP を抽出する。抽出液中の cAMP 量は、cAMP EIA キット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定する。フォルスコリン刺激によって産生された cAMP 量を 100% とし、1 nM の MCH もしくはその誘導体の添加によって抑制された cAMP 量を 0% として、MCH もしくはその誘導体による cAMP 産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。MCH もしくはその誘導体の活性を阻害して cAMP 産生活性が例えば 50% 以上になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

cAMP 産生促進活性を測定するには、フォルスコリンを添加せずに CHO/SLT 細胞に試験化合物を添加して産生された cAMP を上記の方法で定量する。

20

(3) CRE (cAMP response element) を含む DNA を、ピッカジーン ベイシックベクターまたはピッカジーン エンハンサーベクター (東洋インキ製造 (株)) のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに挿入し、これを CRE-レポーター遺伝子ベクターとする。CRE-レポーター遺伝子ベクターをトランスフェクションした細胞において、cAMP 上昇を伴う刺激は、CRE を介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内の cAMP 量の変動を検出することができる。CRE-レポーター遺伝子ベクターを SLT 発現細胞にトラン

25



スフェクションした細胞を利用してMCHとSLTの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- CRE-レポーター遺伝子導入SLT発現細胞を24穴プレートに $5 \times 10^3$  cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)で洗浄する(以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mM HEPESを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。
- 10 反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1nMのMCHもしくはその誘導体あるいは1nMのMCHもしくはその誘導体および試験化合物と2 $\mu$ Mフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤(東洋インキ製造(株))で溶かし、溶解液に発光基質(東洋インキ製造(株))を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、
- 15 液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。MCHとSLTの結合を変化させる化合物の影響はルシフェラーゼによる発光量をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与によりフォルスコリン刺激による発光量の増加が抑制されるが、この抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。
- 20 一方、試験化合物のみを投与し、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量のMCHもしくはその誘導体と同様な抑制を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。
- 25 レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼあるいは $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製

Lumi-Phos 530 によって、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) 活性は、例えば和光純薬製 FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit によって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製 Aurora Gal-XE によって測定することができる。

(4) SLT 発現細胞は MCH 刺激の結果アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。あらかじめ、放射活性を有するアラキドン酸を細胞に取り込ませておくことによって、この活性を細胞外に放出された放射活性を測定することによって測定することができる。測定は、後述の実施例 9 またはそれに準じた方法により行われる。このとき、MCH もしくはその誘導体あるいは MCH もしくはその誘導体および試験化合物を添加して、MCH もしくはその誘導体のアラキドン酸代謝物放出活性に対する影響を調べることにより、MCH と SLT の結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。このとき、MCH もしくはその誘導体によるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。また、試験化合物のみを添加し、SLT 発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を後述の実施例 9 に準じた方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。MCH と SLT の結合に影響を与える化合物のスクリーニング法より具体的に以下に述べる。

CHO/SLT 細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cell/well で播種し、24 時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を  $0.25 \mu\text{Ci/well}$  となるよう添加する。 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸添加 16 時間後、細胞を 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハンクスバッファー (pH7.4) で洗浄し、各 well に 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハンクスバッファー (pH7.4) に溶解した終濃度 10 nM の MCH もしくはその誘導体あるいは 10 nM の MCH もしくはその誘導体および試験化合物を含むバッファー 500  $\mu\text{l}$  を添加する。以降、0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハンクスバッファー (pH7.4) を反応用バッファーと呼ぶ。37℃ で 60 分間インキュベートした後、反応液 400  $\mu\text{l}$  をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した  $[^3\text{H}]$ ア

ラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。MCHもしくはその誘導体の非添加反応バッファーによる培地中の $^3\text{H}$ アラキドン酸代謝物の量を0%とし、10 mMのMCHもしくはその誘導体を添加したときの培地中の $^3\text{H}$ アラキドン酸代謝物の量を100%として試験化合物のMCHもしくはその誘導体とSLTの結合に対する影響を算出する。アラキドン酸代謝物産生活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

(5) SLT発現細胞をMCHによって刺激することによって細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇する。これを利用することによってMCHとSLTの結合に対する試験化合物の影響を調べることができる。具体的には、後述の実施例8またはそれに準じた方法で調べることができる。

SLT発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、2日後、培養液を4 mM Fura-2 AM (同仁化学研究所) を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、蛍光測定器で、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加えたときの励起波長340nm及び380nmでの505nmの蛍光強度の比の上昇を測定する。このとき、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって生じる蛍光強度の変化を測定することによりMCHとSLTの結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。また、以下のようにFLIPR (モレキュラーデバイス社製) を使うこともできる。すなわち、細胞懸濁液にFluo-3 AM (同仁化学研究所製) を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様にMCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される蛍光強度が変化することを測定することにより、MCHもしくはその誘導体とSLTの結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。これらにおいて、

MCHもしくはその誘導体による蛍光強度の上昇を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- 5        S L T発現細胞に aequorin などのように細胞内 Ca イオンの上昇によって発光するようなタンパク質の遺伝子を共発現させておき、細胞内 Ca イオン濃度の上昇によって aequorin が Ca 結合型となり発光することを利用して、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を加え、MCHもしくはその誘導体を単独で投与したときに比べて試験化合物の添加によって観測される発光強度が変化することを測定することにより、MCHとS L Tの結合に対して影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。方法は、蛍光物質を取り込ませないこと以外は上記と同様である。
- 10
- 15        (6) 受容体を発現する細胞に受容体アゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度が上昇することが知られている。MCHによって生じるS L T細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとS L Tの結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。24穴プレートに播いて1日目の細胞に myo-[2-<sup>3</sup>H]inositol (2.5 マイクロ Ci/well) を
- 20        添加した培地中で1日培養した細胞を、よく洗浄後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後、10%過塩素酸を加え反応を止める。1.5 M KOH, 60mM HEPES 溶液で中和し、0.5mlのAG1x8 樹脂 (Bio-Rad) を詰めたカラムに通し、5mM Na<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 60mM HCOONH<sub>4</sub> で洗浄した後、1 M HCOONH<sub>4</sub> 0.1M HCOOH で溶出した放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。MCHもしくはその誘導体の非添加反応バッ
- 25        ファーによる培地中の放射活性を 0%とし、MCHもしくはその誘導体を添加したときの培地中の放射活性を 100%として試験化合物のMCHもしくはその誘導体とS L Tの結合に対する影響を算出する。イノシトール三リン酸産生活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質と

して選択することができる。一方、試験化合物のみの添加によるイノシトール三リン酸産生上昇を観察することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- 5 (7) TRE (TPA response element) を含むDNAを、ピッカジーン ベイシ  
ックベクターまたはピッカジーン エンハンサーベクター (東洋インキ製造  
(株)) のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、  
これを TRE-レポーター遺伝子ベクターとする。TRE-レポーター遺伝子ベク  
ターをトランスフェクションした細胞において、細胞内 Ca イオン上昇を伴  
10 う刺激は、TRE を介したルシフェラーゼ遺伝子発現とそれに引き続くルシフ  
ェラーゼタンパク質の産生を誘導する。つまり、ルシフェラーゼ活性を測定  
することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム  
量の変動を検出することができる。TRE-レポーター遺伝子ベクターを S L  
T 発現細胞にトランスフェクションした細胞を利用した MCH と S L T の結  
15 合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- TRE-レポーター遺伝子導入 S L T 発現細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^3$   
cell/well で播種し、48 時間培養する。細胞を 0.05% BSA と 20mM HEPES を  
含むハンクスバッファー (pH7.4) で洗浄した後、10 nM の MCH もしくはその  
誘導体あるいは 10 nM の MCH もしくはその誘導体および試験化合物を添加  
20 し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤 (東洋  
インキ製造 (株)) で溶かし、溶解液に発光基質 (東洋インキ製造 (株))  
を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレ  
ーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。MCH もしく  
はその誘導体と S L T の結合を変化させる化合物の影響は、ルシフェラーゼ  
25 による発光量を MCH もしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較する  
ことによって測定することができる。このとき、MCH もしくはその誘導体  
の投与により細胞内 Ca イオンの上昇によって発光量が増加するが、この増加  
を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができ  
る。一方、試験化合物のみを投与し、MCH もしくはその誘導体と同様な発

光量の増加を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ以外に例えばアルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼあるいはβ-ガラクトシダーゼを用いることもできる。これらのレポーター遺伝子の遺伝子産物の酵素活性は以下のように市販の測定キットを用いて容易に測定することができる。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製 Lumi-Phos 530 によって、クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase) 活性は、例えば和光純薬製 FAST CAT  
10 chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit によって、β-ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製 Aurora Gal-XE によって測定することができる。

(8) MCHに応答したSLT発現細胞はMAP kinase 活性化によって増殖が  
15 観察される。この増殖をMAP kinase 活性、チミジン取り込み、細胞数測定 (MTT など) によって測定することができる。これを利用してMCHもしくはその誘導体とSLTの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。

MAP kinase 活性は、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその  
20 の誘導体および試験化合物を細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAP kinase 抗体を用いた免疫沈降によってMAP kinase 分画を得た後、例えば和光純薬製 MAP Kinase Assay Kit とγ-[<sup>32</sup>P]-ATP を使用して容易に測定できる。チミジン取り込み活性は、SLT発現細胞を播き、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後、[methyl-<sup>3</sup>H]-  
25 チミジンを加え、その後、細胞内に取り込まれた標識チミジンの放射活性を細胞を溶解して液体シンチレーションカウンターで計数することによって測定することができる。

SLT発現細胞の増殖は、発現細胞を播き、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物を添加した後にMTT (3-

(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加し、細胞内に取り込まれて MTT が変化した MTT ホルマザンを塩酸酸性としたイソプロパノールで細胞を溶解した後、570 nm の吸収を測定することによっても測定できる。

- 5 MCH と S L T の結合を変化させる化合物の、標識チミジン取り込み活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

- S L T 発現細胞を 24 穴プレートにウェル当たり 5000 個まき一日間培養する。次に血清を含まない培地で 2 日間培養し、細胞を飢餓状態にする。MCH もしくはその誘導体あるいは MCH もしくはその誘導体および試験化合物を細胞に添加して 24 時間培養した後、[methyl-<sup>3</sup>H]-チミジンをウェル当たり 0.015 MBq 添加し 6 時間培養する。細胞を P B S で洗った後、メタノールを添加して 10 分間放置する。次に 5% トリクロロ酢酸を添加して 15 分間放置後、固定された細胞を蒸留水で 4 回洗う。0.3 N 水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定する。MCH と S L T の結合を変化させる化合物の影響は、  
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000
- チミジン取り込みによる放射活性の上昇を MCH もしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCH もしくはその誘導体の投与による放射活性の増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCH もしくはその誘導体と同様な放射活性の増加を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- (9) S L T 発現細胞に MCH を添加すると、K channel が活性化し、細胞内にある K イオンが、細胞外に流出する。K イオンと同族元素である Rb イオンは、K イオンと区別無く K channel を通って細胞外に流出するので、細胞に標識 Rb ([<sup>86</sup>Rb]) を添加して取り込ませておいた後、MCH の刺激によって流出する [<sup>86</sup>Rb] の流れを測定することで MCH の作用を測定できる。MCH と S L T の結合を変化させる化合物の、[<sup>86</sup>Rb] 流出活性を利用した具体的なスクリーニング法を以下に記す。

24穴にまいて2日後のSLT発現細胞を1 mCi/ml の<sup>86</sup>RbClを含む培地  
中で2時間保温する。培地をよく洗浄し、外液中の<sup>86</sup>RbClを完全に除く。M  
CHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合  
物を細胞に添加して30分後の外液を回収し、 $\gamma$ カウンターで放射活性を測  
5 定する。MCHもしくはその誘導体とSLTの結合を変化させる化合物の影  
響は、<sup>86</sup>Rb流出による放射活性の上昇をMCHもしくはその誘導体を単独で  
投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、M  
CHもしくはその誘導体の投与による放射活性の上昇を抑制する化合物を拮  
抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物  
10 のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な放射活性の上昇を観察す  
ることによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

(10) SLT発現細胞がMCHに反応して変化する細胞外のpH(acidification  
rate)をCytosensor装置(モレキュラーデバイス社)を使用して  
15 測定することによって、MCHの活性を測定することができる。Cytos  
ensor装置を利用した、細胞外pH変化の測定をすることによるMCH  
とSLTの結合を変化させる化合物の具体的なスクリーニング法を以下に記  
す。

SLT発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、  
20 装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間0.1% BSA  
を含むRPMI1640培地(モレキュラーデバイス社製)を灌流させる。pHが安  
定した後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体お  
よび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させることによって生じる培地の  
pH変化を測定する。MCHとSLTの結合を変化させる化合物の影響は、S  
25 LT発現細胞の細胞外pH変化をMCHもしくはその誘導体を単独で投与し  
た場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHも  
しくはその誘導体の投与による細胞外pH変化を抑制する化合物を拮抗阻害  
能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを  
投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な細胞外pH変化を観察すること



によりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

- (11) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の haploid  $\alpha$ -mating Type (MAT  $\alpha$ ) の性フェロモン受容体 Ste2 は G 蛋白 Gpa1 とカップルしており、性フェロモン  $\alpha$ -mating factor に応答して MAP kinase を活性化し、以下、Far1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子 Ste12 が活性化される。Ste12 は接合に関与する FUS1 を含む種々の蛋白の発現を誘導する。一方、制御因子 Sst2 は以上の過程に抑制的に機能する。この系において、受容体遺伝子を導入した酵母を作製し、受容体アゴニスト刺激によって酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などの指標を用いた、受容体アゴニストと受容体との反応の測定系の試みが行なわれている (Pausch, M. H., Trends in Biotechnology, vol. 15, pp. 487-494 (1997))。このような受容体遺伝子導入酵母の系を利用して MCH および S L T の結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。
- 15 MAT  $\alpha$  酵母の Ste2 および Gpa1 をコードする遺伝子を除去し、代わりに S L T 遺伝子および Gpa1-Gai2 融合蛋白をコードする遺伝子を導入する。Far をコードする遺伝子を除去して cell-cycle arrest が生じないようにし、また、Sst をコードする遺伝子を除去することによって MCH に対する応答の感度を向上させておく。さらに、FUS1 にヒスチジン生合成遺伝子 HIS3 をつなげた FUS1-HIS3 遺伝子を導入する。以上の遺伝子組換え操作は例えば、Price ら (Price, L. A. et al., Molecular and Cellular Biology, vol. 15, pp. 6188-6195 (1995)) の報告に記載の方法において、ソマトスタチン受容体タイプ 2 (SSTR2) 遺伝子を S L T に置き換えて実施することによって容易に行なうことができる。こうして構築された形質変換酵母は S L T のリガンドである MCH に高感度で反応し、その結果 MAP キナーゼの活性化が起きてヒスチジン生合成酵素が合成されるようになって、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。これを利用して、ヒスチジン欠乏培地での酵母の生育を指標として MCH による S L T 発現酵母の応答を観察することができる。
- 25

上記のようにして作製された形質変換酵母を完全合成培地の液体培地で終

夜培養し、 $2 \times 10^4$  cell/ml の濃度でヒスチジンを除去した溶解寒天培地に加え、 $9 \times 9$  cm の角形シャーレに播く。寒天が固化した後、MCHもしくはその誘導体あるいはMCHもしくはその誘導体および試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、 $30^\circ\text{C}$ で3日間培養する。MCHもしくはその誘導体とSLTの結合を変化させる化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育をMCHもしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCHもしくはその誘導体の投与による酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCHもしくはその誘導体と同様な酵母の生育を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。また、あらかじめ、寒天培地にMCHもしくはその誘導体を添加しておいて滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察することによってもMCHとSLTの結合を変化させる化合物の影響を調べることができる。

(12) SLT遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、MCHによって刺激すると細胞内Caイオン濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これを膜電位の変化としてとらえることが出来る(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。MCHによって生じるSLT導入アフリカツメガエル卵母細胞におけるこの反応を観察することによりMCHとSLTの結合に影響を与える化合物のスクリーニングを行なうことができる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液( $88\text{mM NaCl}$ ,  $1\text{mM KCl}$ ,  $0.41\text{mM CaCl}_2$ ,  $0.33\text{mM Ca(NO}_3)_2$ ,  $0.82\text{mM MgSO}_4$ ,  $2.4\text{mM NaHCO}_3$ ,  $10\text{mM HEPES}$ ,  $\text{pH}7.4$ )に溶かしたコラーゲナーゼ( $0.5\text{mg/ml}$ )で卵塊がほぐれるまで $19^\circ\text{C}$ 、1-6時間、 $150\text{rpm}$ で処理する。外液をMBS液に置換することで3度洗浄し、マイクロマニピュレーターでpoly(A)<sup>+</sup> SLT cRNA ( $50\text{ng}/50\text{nl}$ )をマイクロインジェクションする。SLT

mRNA は、組織や細胞から調製しても、プラスミドから *in vitro* で転写してもよい。これを MBS 液中で 20℃ で 3 日培養する。これを Ringer 液を流している voltage clamp 装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極、電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(-)極は、細胞外に置く。電位が安定したら、MCH もしくはその誘導体または MCH もしくはその誘導体および試験化合物を含む Ringer 液を流して電位変化を記録する。MCH と SLT の結合を変化させる化合物の影響は、SLT 導入アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を MCH もしくはその誘導体を単独で投与した場合と比較することによって測定することができる。このとき、MCH もしくはその誘導体の投与による細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。一方、試験化合物のみを投与し、MCH もしくはその誘導体と同様な細胞膜電位変化を観察することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

この系において、反応を変化量を増大して測定しやすいように各種の Gタンパク質遺伝子の poly(A)<sup>+</sup> RNA を導入することもできる。また aequorin のような Ca 存在下で発光を生じるようなタンパクの遺伝子の poly(A)<sup>+</sup> RNA を共インジェクションすることにより膜電位変化ではなく発光を観察してこの反応を測定することもできる。

MCH またはその塩と SLT またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、SLT またはその塩、SLT を含有する細胞、あるいは SLT を含有する細胞の膜画分、および MCH もしくはその誘導体またはその塩を含有するものである。

上記のとおり、本発明に用いられる MCH は、SLC-1 に対してもリガンド活性を有することが知られているため、上述の MCH と SLT を用いるスクリーニング方法を SLT の代わりに SLC-1 を用いることによって実施し、MCH と SLC-1 との結合性を変化させる化合物またはその塩 (SLC-1 アンタゴニスト、SLC-1 アゴニスト) をスクリーニングすることが可能である。

従って、本発明のスクリーニング方法によって得られる「MCH と SLT

との結合性を変化させる化合物またはその塩（SLTアンタゴニスト、SLTアゴニスト）」の活性と、SLTの代わりにSLC-1を用いることにより、本発明のスクリーニング方法またはそれに準じた方法によって得られる「MCHとSLC-1との結合性を変化させる化合物またはその塩（SLC-1アンタゴニスト、SLC-1アゴニスト）」の活性とを比較することによって、「MCHとSLC-1との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩（SLC-1により選択的な活性を有するアンタゴニストもしくはアゴニスト）」、または「MCHとSLTとの結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩（SLTにより選択的な活性を有するアンタゴニストもしくはアゴニスト）」を得ることができる。

ここで、「結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩」とは、

(1) SLC-1またはSLTのいずれか一方に対する活性（受容体（SLC-1またはSLT）を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの変化などを促進する活性など）など）が他方に対する活性に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、量的に異なる化合物またはその塩、および（または）

(2) SLC-1またはSLTのいずれか一方に対する結合力（例、 $IC_{50}$ 値）が、他方に対する結合力に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上、異なる化合物またはその塩のことをいう。

すなわち、「SLC-1により選択的な活性を有するアンタゴニスト」とは、

(1) SLC-1に対する活性（受容体（SLC-1）を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの変化などを促進する活性など）など）がSLTに対する活性に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上弱い化合物またはその塩、および（または）

(2) SLC-1に対する結合力が、SLTに対する結合力に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上強い化合物またはその塩のことをいう。

「SLC-1により選択的な活性を有するアゴニスト」とは、

- 5 (1) SLC-1に対する活性(受容体(SLC-1)を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの変化などを促進する活性など)など)がSLTに対する活性に対して通常2倍以上、  
10 好ましくは10倍以上強い化合物またはその塩、および(または)

(2) SLC-1に対する結合力が、SLTに対する結合力に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上強い化合物またはその塩のことをいう。

「SLTにより選択的な活性を有するアンタゴニスト」とは、

- 15 (1) SLTに対する活性(受容体(SLT)を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの変化などを促進する活性など)など)がSLC-1に対する活性に対して通常2倍以上、好  
20 ましくは10倍以上強い化合物またはその塩、および(または)

(2) SLTに対する結合力が、SLC-1に対する結合力に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上強い化合物またはその塩のことをいう。

「SLTにより選択的な活性を有するアゴニスト」とは、

- 25 (1) SLTに対する活性(受容体(SLT)を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの変化などを促進する活性など)など)がSLC-1に対する活性に対して通常2倍以上、好

ましくは10倍以上強い化合物またはその塩、および（または）

（2）SLTに対する結合力が、SLC-1に対する結合力に対して通常2倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上強い化合物またはその塩のことをいう。

5

このように、本発明は、さらに、

①MCHもしくはその誘導体またはその塩；②SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および③SLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする、

10

1）MCHもしくはその誘導体またはその塩と、

2）（i）SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および／または

15

（ii）SLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本スクリーニング方法によれば、

20

（a）MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩；

（b）MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩；および

25

（c）（i）MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性；および（ii）MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

上記スクリーニング方法において、MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLTもしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることが好ましい。

5

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

10 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②SLT標品およびSLC-1標品

15 SLTを発現させたCHO細胞またはSLC-1を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95% airで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したMCH。

20 適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

##### ④リガンド標準液

MCHを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

#### 2. 測定法

25 ①12穴組織培養用プレートにて培養したSLTまたはSLC-1を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5  $\mu\text{l}$ 加えた後、標識したMCHを5  $\mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試

験化合物のかわりに  $10^{-3}$ M のリガンド (MCH) を  $5\mu\text{l}$  加えておく。

③反応液を除去し、 $1\text{ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンド (MCH) を  $0.2\text{N}$  NaOH- $1\%$  SDS で溶解し、 $4\text{ml}$  の液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

- 5 ④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

10 B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

$B_0$  : 最大結合量

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得ら  
15 れる化合物またはその塩は、MCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合を変化させる (結合を阻害あるいは促進する) 化合物であり、具体的にはSLTを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆるSLTアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるSLTアンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチ  
20 ド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記SLTアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の (i) または (ii) に従えばよい。

- (i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセ  
25 イを行い、MCHまたはその塩とSLTまたはその塩との結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記したSLTを介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSLTアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はSLTアンタゴニストである。



(ii) (a) 試験化合物をSLTを含有する細胞に接触させ、上記SLTを介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSLTアゴニストである。

5 (b) SLTを活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはSLTアゴニストなど）をSLTを含有する細胞に接触させた場合と、SLTを活性化する化合物および試験化合物をSLTを含有する細胞に接触させた場合における、SLTを介した細胞刺激活性を測定し、比較する。SLTを活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はSLTアンタゴニストである。

10 該SLTアゴニストは、SLTに対するMCHまたはその塩が有する生理活性と同様の作用を有しているので、MCHまたはその塩と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、SLTアンタゴニストは、SLTに対するMCHまたはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

また、SLC-1を用いる本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、MCHまたはその塩とSLC-1またはその塩との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはSLC-1を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるSLC-1アゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるSLC-1アンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

25 上記SLC-1アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は前記(i)または(ii)に準じて行えばよい。

該SLC-1アゴニストは、SLC-1に対するMCHまたはその塩が有する生理活性と同様の作用を有しているので、MCHまたはその塩と同様に

安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、SLC-1アンタゴニストは、SLC-1に対するMCHまたはその塩が有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

5

- MCHまたはその塩は食欲（摂食）増進作用およびオキシトシン分泌促進作用などに関与していることから、食欲（摂食）増進剤またはオキシトシン分泌促進剤などとして用いることができるため、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物のうち、SLTアゴニストおよびSLC-1アゴニストは食欲（摂食）増進剤として用いることができる他、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞、神経性食欲不振症などの食欲不振およびそれに伴う貧血、低蛋白症などの予防・治療薬などとして用いることができ、SLTアンタゴニストおよびSLC-1アンタゴニストは肥満症〔例、悪性肥満細胞症(malignant mastocytosis)、外因性肥満(exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症(hyperinsular obesity)、過血漿性肥満(hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満(hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症(hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症(hypothyroid obesity)、視床下部性肥満(hypothalamic obesity)、症候性肥満症(symptomatic obesity)、小児肥満(infantile obesity)、上半身肥満(upper body obesity)、食事性肥満症(alimentary obesity)、性機能低下性肥満(hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症(systemic mastocytosis)、単純性肥満(simple obesity)、中心性肥満(central obesity)など〕、摂食亢進症(hyperphagia)、情動障害、性機能障害などの予防・治療薬などとして用いることができる他、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群、糖尿病およびその合併症（糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害など）、高血圧、高脂血症、冠状動脈硬化症、痛風、呼吸器疾患(Pickwick症候群、睡眠時無呼吸症候群)、脂肪肝、不妊症、変形性骨関節症など（特に抗肥満剤（薬）、食欲（摂食）調節剤など）の予防・治療薬な
- 10
- 15
- 20
- 25

どとして用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、

5 塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエ  
10 ルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩などがあげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン  
15 酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、  
20 オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、該医薬は、必要に応じて糖衣や腸溶性被  
25 膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。本発明の医薬は、例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香

味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチ
- 10 エリーののような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。
- 15 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート
- 20 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例
- 25 えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳

乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から300mg、より好ましくは約3.0から50mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の肥満症患者（体重60kgとして）への投与においては、SLCアンタゴニストを一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

15 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

20	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
25	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン

	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
5	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
10	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	TFA	: トリフルオロ酢酸
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	Gly または G	: グリシン
15	Ala または A	: アラニン
	Val または V	: バリン
	Leu または L	: ロイシン
	Ile または I	: イソロイシン
	Ser または S	: セリン
20	Thr または T	: スレオニン
	Cys または C	: システイン
	Met または M	: メチオニン
	Glu または E	: グルタミン酸
	Asp または D	: アスパラギン酸
25	Lys または K	: リジン
	Arg または R	: アルギニン
	His または H	: ヒスチジン
	Phe または F	: フェニルアラニン
	Tyr または Y	: チロシン

	TrpまたはW	: トリプトファン
	ProまたはP	: プロリン
	AsnまたはN	: アスパラギン
	GlnまたはQ	: グルタミン
5	pGlu	: ピログルタミン酸
	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
10	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	NMP	: N-メチルピロリドン
	PAM	: フェニルアセトアミドメチル

15 また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	HONB	: N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
20	Bzl	: ベンジル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロルベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
25	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	TFA	: トリフルオロ酢酸
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル

- Bum : ターシャリープトキシメチル  
 Trt : トリチル  
 BSA : ウシ血清アルブミン  
 CHAPS : 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]  
 5 -1-プロパンスルホナート  
 PMSF : フェニルメチルスルホニルフルオリド  
 E64 : (L-3-trans-カルボキオキシラン-2-カルボ  
 ニル) L-ロイシル-アグマチン  
 GDP : グアノシン-5'-ニリン酸  
 10 MEMα : ミニマムエッセンシャルメジウムアルファ  
 Fura-2AM : 1-[6-アミノ-2-(5-カルボキシ-2-オキサゾリル)-5-  
 ベンゾフラニロキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)-エタン-N,N,N',N'-  
 四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル  
 HBSS : ハンクス平衡塩液  
 15 Fluor-3AM : 1-[2-アミノ-5-(2,7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキ  
 シ-9-キサントニル) フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-  
 N,N,N',N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル  
 HEPES : 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジ  
 ニル]エタンスルホン酸  
 20 MeBzl : 4-メチルベンジル  
 NMP : N-メチルピロリドン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

25 ヒト SLT をコードする cDNA のクローニングに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：2〕

ヒト SLT をコードする cDNA のクローニングに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：3〕

ヒト SLT の全アミノ酸配列を示す。



〔配列番号：4〕

5'側に Sal I 認識配列が付加され、また 3'側に Spe I 認識配列が付加されたヒト SLT cDNA の全塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

- 5 ヒト SLT 発現 CHO 細胞の各クローンにおける SLT mRNA の発現量を測定するために使用したリボプローブ (riboprobe) を示す。

〔配列番号：6〕

メラニン凝集ホルモン (melanin-concentrating hormone, MCH) のアミノ酸配列を示す。

- 10 〔配列番号：7〕

ヒト SLT をコードする cDNA をクローニングするために使用した合成 DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

- 15 ヒト SLT をコードする cDNA をクローニングするために使用した合成 DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

配列番号：3 で表わされるアミノ酸配列を有するヒト SLT をコードする cDNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

- 20 Des-Asp<sup>1</sup>-MCH (MCH(2-19)) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>]-MCH (MCH(3-19)) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>]-MCH (MCH(4-19)) のアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：13〕

Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>, Met<sup>4</sup>]-MCH (MCH(5-19)) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：14〕

Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>, Met<sup>4</sup>, Leu<sup>5</sup>]-MCH (MCH(6-19)) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>, Met<sup>4</sup>, Leu<sup>5</sup>, Arg<sup>6</sup>]-MCH (MCH(7-19))のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット SLC-1 の全アミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：17〕

ヒト SLC-1 の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：16 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を示す。

10 〔配列番号：19〕

配列番号：17 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA の塩基配列を示す。

後述の参考例1で得られた *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pCR3.1-h  
15 SLT は、平成11年（1999年）4月28日から日本国茨城県つくば市  
東1-1-3、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）  
に寄託番号 FERM BP-6710 として、平成11年（1999年）4  
月20日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号 IFO 16284 として寄託されて  
20 いる。

#### 実施例

以下に実施例および参考例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

25

参考例1 ヒト海馬 cDNA からヒト SLT 受容体タンパクをコードする cDNA のクローニング

ヒト海馬 cDNA（クロンテック社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：7）およびプライマー2（配列番号：8）を用いて PCR

反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA の 10 分の 1 量を鋳型として使用し、Advantage 2 Polymerase Mix (クロンテック社) 1/50 量、プライマー 1 (配列番号: 7) およびプライマー 2 (配列番号: 8) を各 0.2  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、① 94℃・1 分の後、② 94℃・20 秒、72℃・2 分のサイクルを 3 回、③ 94℃・20 秒、65℃・20 秒、68℃・2 分のサイクルを 3 回、④ 94℃・20 秒、58℃・20 秒、68℃・2 分のサイクルを 36 回繰り返し、③ 最後に 68℃・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応後の反応産物を TA クローニングキット (インビトロジェン社) の処方に従いプラスミドベクター pCR3.1 (インビトロジェン社) へ サブクローニングした。これを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入し、cDNA をもつクローンをアンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 9) を得た。この cDNA より導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 3) を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を hSLT と命名し、この形質転換体を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pCR3.1-hSLT と命名した。

参考例 2 Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>]-MCH (MCH(4-19), Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val) の製造

市販 Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂 0.6 g を p-クレゾール 2 g、1,4-ブタンジチオール 1.2 ml と共に無水弗化水素 10 ml 中、0℃・60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を濾過する。この沈殿に 50%酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50%酢酸水で充填したセファデックス (商品名) G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付

- し、同溶媒で展開、主要画分を集め LiChroprep (商品名) RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1% TFA 水 200 ml で洗浄、0.1% TFA 水 300 ml と 0.1% TFA 含有 40% アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め濃縮する。此れを約 4 ml の酢酸に溶解し、蒸留
- 5 水で 240 ml に希釈の後、アンモニア水を用い pH 7.5 に調整し、緩やかに空気を吹込み攪拌する。反応を HPLC で追跡し、SH 体ペプチドのピークがすべて SS 体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液の pH を 3 に調整し、上記 LiChroprep (商品名) RP-18 カラムに吸着する。カラムを 0.1% TFA 水 200 ml で洗浄後、0.1% TFA 水 300 ml と 0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水 300 ml
- 10 を用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め、凍結乾燥し目的とするペプチドを得る。

質量分析による  $(M+H)^+$  2009.9 (理論値 2010.0)

HPLC 溶出時間 : 17.9 分

カラム条件

- 15 カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)  
溶離液 : A 液 - 0.1% TFA 含有 10% アセトニトリル水、B 液 - 0.1% TFA 含有 60% アセトニトリル水を用い、A/B : 20/80 ~ 80/20 へ直線型濃度勾配溶出 (20 分)  
流速 : 1.0 ml/分

20 参考例 3 ラジオアイソトープ標識 MCH(4-19) の作製

- 参考例 2 で調製した MCH の N 末端アミノ酸 3 残基欠失体である MCH(4-19) を、ボルトン-ハンター法でラジオアイソトープ標識した。チューブの中でベンゼンに溶解している  $[^{125}\text{I}]$ -ボルトン-ハンター試薬 (3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオン酸 N-スクシンイミジル) 9.25 MBq (0.11 nmol)
- 25 (NEN ライフサイエンスプロダクツ社、81.4 TBq/nmol) に乾燥窒素ガスを吹き付けて、ベンゼンを溜去した。このチューブに、18  $\mu\text{l}$  の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) と 1.5  $\mu\text{l}$  のジメチルスルフォキシドに溶解した 2.3 nmol の MCH(4-19) と 0.5  $\mu\text{l}$  のジメチルスルフォキシドを添加し、よく混合した。混合液を 37°C で 2 時間保温した後、ボルトン-ハンター試薬による MCH(4-19)

の放射化誘導体である $[^{125}\text{I}]\text{-[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met^4]\text{-MCH(4-19)}$ を逆相 HPLC により分取した。 $[^{125}\text{I}]\text{-[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met^4]\text{-MCH(4-19)}$ は、ODS カラム (トーソー、ODS-80TM (4.6 mm x 150 mm)) からアセトニトリル濃度 43.6%付近に  
5 溶出した。

参考例 4 手動エドマン分解による MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、  
MCH(5-19)、MCH(6-19)および MCH(7-19) (配列番号: 10-15) の調製

MCH 0.1 mg (シグマ社) を 30  $\mu\text{l}$  の 50%ピリジンに溶解し、1  $\mu\text{l}$  のフェ  
10 ニルイソチオシアネート (和光純薬) を加えて窒素置換した後、45℃に保温  
した。10 分おきに攪拌して1時間を経過したところで保温を止め、窒素気流  
下で乾固した。20  $\mu\text{l}$  のエタノールに再度溶解し、窒素気流下、次いで減圧  
下で溶媒を溜去して乾固した。反応生成物であるフェニルチオカルバモイル  
誘導体を 20  $\mu\text{l}$  のトリフルオロ酢酸 (和光純薬) によって溶解し、窒素置換  
15 して45℃で20分間保温することによりペプチドのアミノ末端アミノ酸をアニ  
リノチアゾリノン誘導体として切断した。窒素気流でトリフルオロ酢酸を除  
いた後、30  $\mu\text{l}$  の水および 100  $\mu\text{l}$  の酢酸 n-ブチルを加え、酢酸 n-ブチルに  
より過剰な試薬およびアニリノチアゾリノン誘導体を抽出して除去した。酢  
酸 n-ブチルによる抽出は3回繰り返した。アミノ末端が1残基短縮された  
20 MCH(2-19)を含む水相を窒素気流下、次いで減圧下で乾固した。

この分解過程を1回のみ行なうことにより、アミノ末端の1残基のみが欠  
失した MCH(2-19)を得た。同様な分解過程を2回、3回、4回、5回あるいは6  
回繰り返すことにより、1残基ずつ N 末端のアミノ基が短縮された MCH(3-19)、  
MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)および MCH(7-19)を得た。

25 上記の分解反応によって得られた MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、  
MCH(5-19)、MCH(6-19)および MCH(7-19)を次のように精製した後、質量分析お  
よびアミノ酸分析によって構造の確認を行なった。以下に MCH(4-19)について  
詳細に述べるが、他の誘導体についてもほぼ同様の操作を行なった。得られ  
た MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)および MCH(7-

19)の分析値を表1に示す。

【表1】 MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)および  
MCH(7-19)の質量分析値およびアミノ酸分析値

5

構造	質量 ( $M+H^+$ ) 測定値 (理論値) 組成式	アミノ酸分析値 (残基数)
MCH(2-19)	2272.3 (2272.1) $C_{101}H_{156}N_{29}O_{23}S_4$	D 1.90 (1), E 2.28 (1), P 1.32 (1), G 2.33 (1), V 1.76 (2), C n. d. (1), M 0.46 (2), L 2.0 (2), Y 0.50 (1), F 0.93 (1), R 1.98 (3)
MCH(3-19)	2124.8 (2125.0) $C_{92}H_{147}N_{28}O_{22}S_4$	D 1.01 (1), E 1.05 (1), P 1.25 (1), G 1.02 (1), V 1.9 (2), C 0.30 (1), M 1.37 (2), L 2.0 (2), Y 0.20 (1), R 2.94 (3)
MCH(4-19)	2009.9 (2010.0) $C_{88}H_{142}N_{27}O_{19}S_4$	E 1.04 (1), P 1.12 (1), G 1.02 (1), V 1.88 (2), C 0.34 (1), M 1.42 (2), L 2.0 (2), Y 0.23 (1), R 2.93 (3)
MCH(5-19)	1878.9 (1878.9) $C_{83}H_{138}N_{26}O_{18}S_3$	E 1.51 (1), P 0.69 (1), G 2.16 (1), V 1.27 (2), C n. d. (1), M 0.38 (1), L 2.0 (2), Y 0.18 (1), R 1.80 (3)
MCH(6-19)	1765.5 (1765.9) $C_{77}H_{122}N_{25}O_{17}S_3$	E 0.69 (1), P 0.79 (1), G 0.70 (1), V 1.21 (2), C 0.15 (1), M 0.50 (1), L 1.0 (1), Y 0.20 (1), R 1.84 (3)
MCH(7-19)	1609.2 (1608.8) $C_{71}H_{110}N_{21}O_{16}S_3$	E 0.90 (1), P 0.62 (1), G 1.03 (1), V 1.05 (2), C 0.07 (1), M 0.33 (1), L 1.0 (1), Y 0.15 (1), R 1.04 (2)

MCH(4-19)を以下のようにHPLCで精製した。Spheri-5 RP-18 逆相高速液体  
クロマトグラフィー用カラム (ブラウンリー社、2.1 mm x 30 mm) にあらか  
じめA液 (0.1%トリフルオロ酢酸) を流速 300  $\mu$  l/min で流し、25℃にて平  
10 衡化した。反応産物は270  $\mu$  lの0.1%トリフルオロ酢酸に溶解し、1回50  $\mu$   
lをカラムに打ち込んだ後、流速300  $\mu$  l/minを保ちながら、30分間かけてB  
液 (0.1%トリフルオロ酢酸/70%アセトニトリル) 濃度を70%まで上昇させた。  
溶出液を210 nmの吸光度でモニターし、ピークを手動で分取した。MCH(4-19)

は17.1分に溶出した。1つの試験管に集めたMCH(4-19)を濃縮乾固し、100  $\mu$ lのDMSOに溶解した。

質量分析は日本電子JMS-HX110でLSIMS法にて行なった。即ち、プローブチップ上で1  $\mu$ lの3-ニトロベンジルアルコールとグリセロールが3:2からなるマトリクスと、1  $\mu$ lのサンプルとを混合し、イオン源に導入した。15 kVに加速されたセシウムイオンを照射し、生成した正二次イオンを10 kVに加速して検出器に導いた。

アミノ酸分析のための加水分解は、サンプル5  $\mu$ lをガラス管にとって減圧乾固し反応バイアルに入れ、その底部に6N共沸塩酸（ピアス社、Sequenal Grade）200  $\mu$ lを入れ、ウォーターズ社Pico-Tagワークステーションを用いてウォーターズ社の推奨する方法に従って脱気後、110℃、24時間保温して行なった。

反応バイアル中の塩酸を真空ポンプにより減圧下除去した後、150  $\mu$ lの20 mM塩酸で試料を希釈し、分析バイアルに注入してアミノ酸分析装置にセットし、100  $\mu$ lを分析に供した。アミノ酸分析は日立L-8500高速アミノ酸分析計を用いて、オルトフタルアルデヒド試薬（和光純薬）を誘導体化反応に用いた蛍光分析法にて分析した。蛍光分析用緩衝液の調製法、反応液の調製法、分析条件は、L-8500アミノ酸分析計取り扱い説明書の記載に従った。ロイシンを基準としたときの測定値のモル比は表1に示したとおりである。

なお、MCHあるいはMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)は参考例7から参考例11に記載した固相合成法によっても調製することができる。

参考例5 MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)およびMCH(5-19)の非アイソトープボルトン-ハンター試薬による誘導体化

MCHおよびMCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)およびMCH(6-19)の非アイソトープボルトン-ハンター試薬による誘導体化を行なった。  
MCH(4-19)の誘導体化を例にして以下に述べる。

ジメチルホルムアミド50  $\mu$ lに溶解したMCH(4-19) 1 nmolに非アイソト

ーポルトン-ハンター試薬である 3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオン酸 N-スクシンイミジル (和光純薬) 100 nmol および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (和光純薬) 100 nmol を加えて 37℃ で 4 時間反応させた。

- 反応混合物に 0.1%トリフルオロ酢酸を含む 10%アセトニトリル 450  $\mu$  l を
- 5 加えて HPLC により精製した。クロマトグラフィーの条件は以下のとおりである。カラムは Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm) で流速は毎分 1.0 ml とした。溶出は 0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル水を用い、アセトニトリル濃度を 2 分間 10%に保持した後、5 分間で 20%まで上昇させ、その後 20 分間に 50%まで上昇させて行なった。MCH(4-19) の非アイソトープポルトン-ハンター試薬による誘導体である [N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロ
- 10 ピオニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19) は 22.9 分に溶出され、手動によって分取した。MCH あるいは MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(5-19) および MCH(6-19) についてもほぼ同様の操作によって N 末端アミノ酸のアミノ基に 3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル基を導入して誘導体化し、HPLC によって分取した。こ
- 15 れらの誘導体を酸加水分解した後、アミノ酸分析を行なった。結果を表 2 に示した。

[表 2] 誘導体化 MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19) および MCH(6-19) のアミノ酸分析値

20

構造	アミノ酸分析値 (残基数)
誘導体化 MCH(2-19)	D 1.01 (1), E 1.05 (1), P 0.86 (1), G 1.09 (1), V 1.69 (2), C n. d. (1), M 1.01 (2), L 2.0 (2), Y 0.27 (1), F 0.90 (1), R 2.59 (3)
誘導体化 MCH(3-19)	D 1.20 (1), E 1.58 (1), P 1.12 (1), G 2.07 (1), V 1.60 (2), C n. d. (1), M 0.94 (2), L 2.0 (2), Y 0.19 (1), R 2.24 (3)
誘導体化 MCH(4-19)	E 1.09 (1), P 1.46 (1), G 1.09 (1), V 1.83 (2), C n. d. (1), M 1.14 (2), L 2.0 (2), Y 0.27 (1), R 2.78 (3)
誘導体化 MCH(5-19)	E 1.10 (1), P 0.90 (1), G 1.34 (1), V 1.55 (2), C n. d. (1), M 0.32 (1), L 2.0 (2), Y 0.32 (1), R 2.28 (3)



参考例6 放射ヨード標識 MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の作製

5     アイソトープ標識 MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(4-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)は以下のようにアミノ酸配列中の Tyr<sup>13</sup>を放射ヨード化して作製することもできる。MCH(4-19)について例示するが、同様の方法によって MCH、MCH(2-19)、MCH(3-19)、MCH(5-19)、MCH(6-19)およびMCH(7-19)の放射ヨード化体を作製することができる。

10     MCH(4-19) 5  $\mu$ g を 25  $\mu$ l の 0.4 M 酢酸ナトリウム (pH 5.6) に溶解し、これに 200 ng のラクトパーオキシダーゼ (和光純薬製) を加えた後、1 mCi の [<sup>125</sup>I]-ヨウ化ナトリウム (アマシャムファルマシアバイオテク社) および 200 ng の過酸化水素 (10  $\mu$ l) を加える。室温で 10 分間静置した後、さらに 200 ng の過酸化水素 (10  $\mu$ l) を加えて 10 分間静置する。これを TSKgel ODS-80Ts カラム (4.6 mm x 25 cm、トーソー) を用いた HPLC によって精製し、[<sup>125</sup>I]-標識 MCH(4-19)を得る。

15

参考例7 MCH (Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val)の製造

市販 Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos),  
20     Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp(OcHex), Boc-Phe, Boc-Asp(OcHex)を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂 0.6 g を p-クレゾール 2 g、1,4-ブタンジチオール 1.2 ml と共に無水弗化水素 10 ml 中、0℃・60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物ヘジエチルエーテルを加え沈殿を濾過する。この沈殿に 50%酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除き、抽出液を十分に濃縮後、50%酢酸水で充填したセファデックス (商品名) G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め LiChroprep (商品名) RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm)

25

- に付け 0.1% TFA 水 200 ml で洗浄、0.1% TFA 水 300 ml と 0.1% TFA 含有 40% アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め濃縮する。此れを約 4 ml の酢酸に溶解し、蒸留水で 240 ml に希釈の後、アンモニア水を用い pH 7.5 に調整し、緩やかに空気を吹込み攪拌する。反応を
- 5 HPLC で追跡し、SH 体ペプチドのピークがすべて SS 体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液の pH を 3 に調整し、上記 LiChroprep (商品名) RP-18 カラムに吸着する。カラムを 0.1% TFA 水 200 ml で洗浄後、0.1% TFA 水 300 ml と 0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行ない、主要画分を集め、凍結乾燥し目的とするペプチドを得る。
- 10 質量分析による  $(M+H)^+$  2387.3 (理論値 2387.9)  
HPLC 溶出時間 : 20.9 分  
カラム条件  
カラム : Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)  
溶離液 : A 液 - 0.1% TFA 含有 10% アセトニトリル水、B 液 - 0.1% TFA 含有 60%  
15 アセトニトリル水を用い、A/B : 20/80 ~ 80/20 へ直線型濃度勾配溶出 (20 分)  
流速 : 1.0 ml/分

参考例 8 Des-Asp<sup>1</sup>-MCH (MCH(2-19), Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val) の製造

- 20 市販 Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp(OcHex), Boc-
- 25 Phe を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂を参考例 7 と同様に脱保護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

質量分析による  $(M+H)^+$  2272.3 (理論値 2272.1)

HPLC 溶出時間 : 20.6 分

カラム条件

カラム: Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液: A液-0.1% TFA 含有 10%アセトニトリル水、B液-0.1%TFA 含有 60%  
アセトニトリル水を用い、A/B: 20/80~80/20 へ直線型濃度勾配溶出 (20 分)  
流速: 1.0 ml/分

5

参考例 9 Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>]-MCH (MCH(3-19), Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val) の製造

市販 Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド  
合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方  
10 法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos),  
Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met,  
Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu, Boc-Met, Boc-Asp(OcHex) を順に  
導入し目的の保護ペプチド樹脂を得る。この樹脂を参考例 7 と同様に脱保護、  
環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

15 質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2124.8 (理論値 2125.0)

HPLC 溶出時間: 19.2 分

カラム条件

カラム: Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液: A液-0.1% TFA 含有 10%アセトニトリル水、B液-0.1%TFA 含有 60%  
20 アセトニトリル水を用い、A/B: 20/80~80/20 へ直線型濃度勾配溶出 (20 分)  
流速: 1.0 ml/分

参考例 1.0 Des-[Asp<sup>1</sup>, Phe<sup>2</sup>, Asp<sup>3</sup>, Met<sup>4</sup>]-MCH (MCH(5-19), Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val-OH) の製造

25 市販 Boc-Val-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.77 mmol/g resin) 0.5 mmol 分をペプチド  
合成機 ABI 430A の反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方  
法で Boc-Gln, Boc-Trp(CHO), Boc-Cys(MeBzl), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos),  
Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Val, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Leu, Boc-Met,  
Boc-Cys(MeBzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Leu を順に導入し目的の保護ペプチド樹

脂を得る。この樹脂を参考例7と同様に脱保護、環化、精製を行い目的のペプチドを得る。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1878.9 (理論値 1878.9)

HPLC 溶出時間: 17.4 分

#### 5 カラム条件

カラム: Wakosil-II 5C18HG (4.6 x 150 mm)

溶離液: A液-0.1% TFA 含有 10%アセトニトリル水、B液-0.1%TFA 含有 60%

アセトニトリル水を用い、A/B: 20/80~80/20 へ直線型濃度勾配溶出 (20 分)

流速: 1.0 ml/分

10

#### 実施例1 ヒト SLT 受容体 cDNA の増幅

参考例1記載の pCR3.1-hSLT を鋳型とし、配列番号: 1 および 2 の合成 DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行なった。合成 DNA プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の 5'側に制限酵素 Sal I の認識する塩基配列が付加され、また 3'側に制限酵素 Spe I の認識する塩基配列が付加されるように、5'側および 3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、pCR3.1-hSLT 鋳型 5  $\mu$  l、合成 DNA プライマー各 0.4  $\mu$  M、0.2 mM dNTPs、pfu (ストラタジーン) DNA ポリメラーゼ 1  $\mu$  l および酵素に付属のバッファーで、総反応量は 50  $\mu$  l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、94℃・60 秒の加熱の後、94℃・60 秒、57℃・60 秒、72℃・150 秒のサイクルを 25 回繰り返す、最後に 72℃で 10 分間反応させた。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

25

#### 実施例2 PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解読による増幅 cDNA 配列の確認

実施例1で行なった PCR の反応産物は 0.8 %の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール

抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって DNA を回収した。PCR-Script™ Amp SK(+) クローニングキット (ストラタジーン) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター-pCR-Script Amp SK(+) へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  competent cell (トーヨーボー) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTG および X-gal を含む LB 寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* DH5  $\alpha$ /hSLT を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晩培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製した DNA の一部を用いて制限酵素 Sal I および Spe I による切断を行ない、挿入されている受容体 cDNA 断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた 2 クローンの配列を解析し全ての配列が報告されているヒト SLT タンパク質 (配列番号: 3) をコードする cDNA 配列の 5' 側に Sal I 認識配列が付加し、3' 側に Spe I 認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認した (配列番号: 4)。図 1 にヒト SLT 受容体蛋白のアミノ酸配列およびそれをコードする DNA 配列を示した。

### 20 実施例 3 ヒト SLT 発現 CHO 細胞の作製

実施例 2 で配列が確認されたヒト SLT の全長アミノ酸配列をコードし、5' 側に Sal I 認識配列が付加し、また 3' 側に Spe I 認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンより Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素 Sal I および Spe I で切断してインサート部分を切り出した。インサート DNA は電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このインサート DNA を Sal I および Spe I で切断した動物細胞発現用ベクタープラスミド pAKK0-111H (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta,

Vol. 1219, pp. 251-259 (1994)記載の pAKK01.11H と同一のベクタープラスミド)に加え、T4 ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミド pAKK0-hSLT を構築した。

- 5 pAKK0-hSLT で形質転換した *E. coli* DH5  $\alpha$  competent cell (トーヨーボー) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いて pAKK0-hSLT のプラスミド DNA を調製した。これを CellPfect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を用い添付のプロトコルに従って CHO dhfr 細胞に導入した。
- 6  $\mu$ g の DNA をリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24 時間前に  $5 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  個の CHO dhfr 細胞を播種した 6 cm シャーレに添加した。10% ウシ胎児血清を含む MEM  $\alpha$  培地で 1 日間培養した後、継代し、選択培地である 10% 透析ウシ胎児血清を含む核酸不含 MEM  $\alpha$  培地で培養した。選択培地中で増殖してくるヒト SLT 発現 CHO 細胞である形質転換細胞のコロニー 46 クロ
- 10 ーンを選択した。

- 15 実施例 4 全長ヒト SLT レセプター蛋白質 mRNA の発現量の高い CHO/hSLT 細胞株の選択

- 実施例 3 で樹立された CHO/hSLT 株 46 クローン的全長ヒト SLT レセプター蛋白質 mRNA の発現量を Cytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテック) を用い、添付のプロトコルに従って以下のように測定した。CHO/hSLT 株
- 20 の各クローンを Cytostar T Plate の各 well に  $2.5 \times 10^4$  個ずつ播種して 24 時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各 well に 0.25% Triton X-100 を添加して細胞の透過性をあげた後、 $^{35}$ S ラベルした配列番号 : 5 の riboprobe を加えてハイブリダイズさせた。20 mg/ml の RNaseA を各 well
- 25 に加えて遊離の riboprobe を消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズした riboprobe の放射活性を Topcounter で測定した。放射活性の高い株が mRNA 発現量が高い。mRNA 発現量の高い 6 クローン (#1, 3, 4, 13, 26 および 36) を以下の実験に用いたが、特にクローン番号 1 を主に用いた。

実施例 5 MCH によるヒト SLT 発現 CHO 細胞に対する cAMP 合成抑制活性

市販の合成ヒト MCH (配列番号: 6、バクケム社) を種々の濃度に希釈し、ヒト SLT 発現 CHO 細胞に対する cAMP 合成抑制活性を以下に示す方法で測定した。実施例 4 で選択した CHO/hSLT 細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cell/well で播種し、48 時間培養した。細胞を 0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハンクスバッファー (pH7.4) で洗浄した (以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと 0.05% BSA と 20mM HEPES を含むハンクスバッファー (pH7.4) を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後 0.5ml の反応用バッファーを加えて 30 分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに 0.25 ml の反応用バッファーを細胞に加えた後、種々の量の MCH と 2  $\mu$ M フォルスコリンを含む 0.25 ml の反応用バッファーを細胞に加え、37°C で 30 分間反応させた。100  $\mu$ l の 20% 過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で 1 時間置くことにより細胞内 cAMP を抽出した。抽出液中の cAMP 量は、cAMP EIA キット (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて測定した。その結果、MCH は 30 pM の濃度で明らかに細胞内 cAMP 量を低下させ、さらにペプチド濃度を増やすと用量依存的に細胞内 cAMP 量は減少した。(図 2)。図中、cAMP 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を 100% として、MCH を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を % として表わした。

#### 実施例 6 ヒト SLT 発現 CHO 細胞膜画分の調製

$1 \times 10^8$  個の CHO/hSLT 細胞に 10ml のホモジネートバッファー (10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 4  $\mu$ g/ml E64, 20  $\mu$ g/ml leupeptin) 添加し、ポリトロン (12,000 rpm, 1 分間) を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心 (1,000 g, 15 分間) して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離 (Beckman Type 30 ローター, 30,000 rpm, 1 時間) し、得られた沈殿物をヒト SLT 発現 CHO 細胞膜画分とした。

実施例 7 ボルトン-ハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19)を用いた受容体結合実験

参考例 3 でボルトン-ハンター試薬を用いて作製した $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19)およびヒト SLT 発現 CHO 細胞から調製した細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

ヒト SLT 発現 CHO 細胞から実施例 6 に従って調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファー (50 mM Tris-HCl、5 mM EGTA (エチレンジグリコールビス (アミノエチルエーテル) 四酢酸)、5 mM 酢酸マグネシウム、0.05% CHAPS、0.1% BSA (ウシ血清アルブミン)、0.25 mM PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド)、1  $\mu\text{g/ml}$  ペプスタチン、20  $\mu\text{g/ml}$  ロイペプチン、pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (ファルコン社、2053) に 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。最大結合量 (TB) を測定するために、2  $\mu\text{l}$  の DMSO と、20 nM の $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19) 2  $\mu\text{l}$  を、また、非特異的結合 (NSB) を測定するために、100  $\mu\text{M}$  MCH の DMSO 溶液 2  $\mu\text{l}$  と、20 nM の $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19) 2  $\mu\text{l}$  を、膜画分溶液に添加した。25  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分間反応させた後、ポリエチレンジイミン処理したガラスフィルター (ワットマン社、GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 $\gamma$ -カウンターを用いてろ紙上に残った $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19) の放射活性を測定した。図 3 に示すように、膜画分の濃度に依存した $[^{125}\text{I}]$ -標識 MCH(4-19) の特異的な結合 (SB) が認められた。

また、膜画分濃度を 30  $\mu\text{g/ml}$  に設定して、阻害率 (%) から MCH の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$  値) を算出したところ、 $\text{IC}_{50}$  値は約 20 nM であった (図 4)。また、MCH のアミノ末端短縮体である MCH(4-19) の  $\text{IC}_{50}$  値は 3.3 nM であった (図 4)。

実施例 8 FLIPR を用いた MCH によるヒト SLT 発現 CHO 細胞の細胞内 Ca イオン濃度上昇活性の測定

実施例 4 で得られたヒト SLT 発現 CHO 細胞の MCH (配列番号: 6) による細胞内 Ca イオン濃度上昇活性の測定を FLIPR (モレキュラーデバイス社) を用いて行った。CHO/hSLT 細胞を  $15 \times 10^4$  cells/ml となるように 10% 透析ウシ胎



児血清を含むDMEMに懸濁し、FLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、コースター社)に分注器を用いて各ウェルに200  $\mu$  l ずつ植え込み ( $3.0 \times 10^4$  cells/200  $\mu$  l/ウェル)、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後、アッセイに用いた(以後このプレートを細胞プレートと言う)。

- 5 HANKS'/HBSS (ニッスイハックス2 (日水製薬株式会社)・9.8 g、炭酸水素ナトリウム 0.35 g、HEPES 4.77 g、6 M 水酸化ナトリウム溶液で pH7.4 に合わせた後、フィルター滅菌処理) 20 ml、250 mM Probenecid 200  $\mu$  l、ウシ胎児血清(FBS) 200  $\mu$  l を混合したものに、Fluo 3-AM (同仁化学研究所) 2
- 10 バイアル(50  $\mu$  g)をジメチルスルフォキサイド 40  $\mu$  l および 20% Pluronic acid (モレキュラープローブ社) 40  $\mu$  l に溶解して加えて混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100  $\mu$  l ずつ分注した後、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートし、細胞に色素を印加した。FLIPR 用 96 穴プレート(V-Bottom プレート、コースター社)の各ウェルに 2.5 mM Probenecid、0.05% BSA を含む HANKS'/HBSS 150  $\mu$  l を
- 15 入れ、さらに種々の濃度の MCH を添加してサンプルプレートを調製した。細胞プレートの色素ローディング終了後、HANKS'/HBSS に 2.5 mM Probenecid を加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー(モレキュラーデバイス社)を用いて細胞プレートを4回洗浄し、洗浄後 100  $\mu$  l の洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートを FLIPR にセットしアッセイを行
- 20 なった(FLIPR により、サンプルプレートから 50  $\mu$  l のサンプルが細胞プレートへと移される)。その結果、MCH は濃度依存的にヒト SLT 発現 CHO 細胞の細胞内 Ca イオン濃度を上昇させることが示された(図5)。

#### 25 実施例9 MCH がヒト SLT 発現 CHO 細胞に対して惹起するアラキドン酸代謝物放出活性

種々の濃度の MCH が示すヒト SLT 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方法により測定した。実施例4で得られたヒト SLT 発現 CHO 細胞である CHO/hSLT 株を 24 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cell/well で播種し、24 時間培養後、<sup>3</sup>H アラキドン酸を 0.25  $\mu$  Ci/well となるよう添加した。<sup>3</sup>H]

アラキドン酸添加 16 時間後、細胞を 0.05% BSA と 20 mM HEPES を含むハンスバッファー (pH7.4) で洗浄し、各 well に種々の濃度の MCH を加えた 0.05% BSA と 20 mM HEPES を含むハンスバッファー (pH7.4) 500  $\mu$  l を添加した。37℃で 60 分間インキュベートした後に、反応液 400  $\mu$  l をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した [<sup>3</sup>H] アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンタにより測定した。その結果、MCH が用量依存的にヒト SLT 発現細胞に対してアラキドン酸代謝物放出活性を示すことが確認され、その EC<sub>50</sub> 値は 0.57nM であった。種々の濃度の MCH が示すヒト SLT 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を図 6 に示した。

10

(配列表フリーテキスト)

配列番号： 6

配列に関する他の情報：第 7 番目および第 16 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

15 配列番号： 10

配列に関する他の情報：第 6 番目および第 15 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号： 11

20 配列に関する他の情報：第 5 番目および第 14 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号： 12

配列に関する他の情報：第 4 番目および第 13 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号： 13

25 配列に関する他の情報：第 3 番目および第 12 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号： 14

配列に関する他の情報：第 2 番目および第 11 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号：15

配列に関する他の情報：第1番目および第10番目の2つのCys残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

5 産業上の利用可能性

- 本発明のMCHもしくはその誘導体またはその塩およびSLTまたはその塩を用いることを特徴とするMCHもしくはその誘導体またはその塩とSLTまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法は、食欲（摂食）増進剤の他、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、
- 10 子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞などの予防・治療薬などとして用いることができるSLTアゴニスト、肥満症〔例、悪性肥満細胞症(malignant mastocytosis)、外因性肥満(exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症(hyperinsular obesity)、過血漿性肥満(hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満(hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満症(hypoplasmic obesity)、甲状腺機能低下肥満症(hypothyroid obesity)、視床下部性肥満(hypothalamic obesity)、症候性肥満症(symptomatic obesity)、小児肥満(infantile obesity)、上半身肥満(upper body obesity)、食事性肥満症(alimentary obesity)、性機能低下性肥満(hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症(systemic mastocytosis)、単純性肥満(simple obesity)、
- 15 中心性肥満(central obesity)など〕、摂食亢進症(hyperphagia)、情動障害、性機能障害などの予防・治療薬などの他、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群などの予防・治療薬などとして用いることができるSLTアンタゴニストのスクリーニング方法として有用である。
- 20

## 請求の範囲

1. メラニン凝集ホルモン(MCH)もしくはその誘導体またはその塩および  
配列番号: 3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチ  
5 ドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特  
徴とするMCHまたはその塩と配列番号: 3で表されるタンパク質もしくは  
その塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステル  
またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング  
方法。
- 10 2. さらにSLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその  
アミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求項  
1記載のスクリーニング方法。
3. MCHもしくはその誘導体またはその塩および配列番号: 3で表される  
タンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドも  
15 ししくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とするMCHまたは  
その塩と配列番号: 3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部  
分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合  
性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
4. さらにSLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその  
20 アミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする請求  
項3記載のスクリーニング用キット。
5. 請求項1記載のスクリーニング方法または請求項3記載のスクリーニ  
ング用キットを用いて得られうる、MCHまたはその塩と配列番号: 3で表さ  
れるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミ  
25 ドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物または  
その塩。
6. 請求項5記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
7. 抗肥満薬である請求項6記載の医薬。
8. MCHが配列番号: 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に

同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項1記載のスクリーニング方法。

9. MCHが配列番号: 6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項3記載のスクリーニング

5 用キット。

10. 誘導体が配列番号: 6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである請求項1記載のスクリーニング方法。

10 11. 誘導体が配列番号: 6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである請求項3記載のスクリーニング用キット。

15 12. 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号: 6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである請求項1記載のスクリーニング方法。

13. 誘導体がボルトンハンター試薬により誘導されたMCHまたはボルトンハンター試薬により誘導された配列番号: 6で表されるアミノ酸配列のN末端から第5番目ないし第19番目の配列を含有するペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルである請求項3記載のスクリーニング用キット。

20 14. MCHもしくはその誘導体またはその塩が  $[^{125}\text{I}]$ -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)またはその塩である請求項1記載のスクリーニング方法。

25 15. MCHもしくはその誘導体またはその塩が  $[^{125}\text{I}]$ -[N-(3-(4-ヒドロキシ-3-ヨードフェニル)プロピオニル)-Met<sup>4</sup>]-MCH(4-19)またはその塩である請求項3記載のスクリーニング用キット。

16. ①MCHもしくはその誘導体またはその塩; ②SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩; および③配列番号: 3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその

塩を用いることを特徴とする、

1) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、

2) (i) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および/または

5 (ii) 配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

17. MCHもしくはその誘導体またはその塩と、配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする請求項16記載のスクリーニング方法。

18. MCHもしくはその誘導体またはその塩と、SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする請求項16記載のスクリーニング方法。

19. MCHもしくはその誘導体またはその塩と、(i) 配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩および(ii) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を選択的に変化させる化合物またはその塩をスクリーニングすることを特徴とする請求項16記載のスクリーニング方法。

20. 20. ①MCHもしくはその誘導体またはその塩；②SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩；および③配列番号：3で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする、

1) MCHもしくはその誘導体またはその塩と、

2) (i) SLC-1またはその塩、またはその部分ペプチドもしくはその

アミドもしくはそのエステルまたはその塩；および／または

(ii) 配列番号：3 で表されるタンパク質もしくはその塩、またはその部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

1/6

☒ 1

ATG AAT CCA TTT CAT GCA TCT TGT TGG AAC ACC TCT GCC GAA CTT TTA AAC AAA TCC TGG  
Met Asn Pro Phe His Ala Ser Cys Trp Asn Thr Ser Ala Glu Leu Leu Asn Lys Ser Trp

AAT AAA GAG TTT GCT TAT CAA ACT GCC AGT GTG GTA GAT ACA GTC ATC CTC CCT TCC ATG  
Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Gln Thr Ala Ser Val Val Asp Thr Val Ile Leu Pro Ser Met

ATT GGG ATT ATC TGT TCA ACA GGG CTG GTT GGC AAC ATC CTC ATT GTA TTC ACT ATA ATA  
Ile Gly Ile Ile Cys Ser Thr Gly Leu Val Gly Asn Ile Leu Ile Val Phe Thr Ile Ile

AGA TCC AGG AAA AAA ACA GTC CCT GAC ATC TAT ATC TGC AAC CTG GCT GTG GCT GAT TTG  
Arg Ser Arg Lys Lys Thr Val Pro Asp Ile Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu

GTG CAC ATA GTT GGA ATG CCT TTT CTT ATT CAC CAA TGG GCC CGA GGG GGA GAG TGG GTG  
Val His Ile Val Gly Met Pro Phe Leu Ile His Gln Trp Ala Arg Gly Gly Glu Trp Val

TTT GGG GGG CCT CTC TGC ACC ATC ATC ACA TCC CTG GAT ACT TGT AAC CAA TTT GCC TGT  
Phe Gly Gly Pro Leu Cys Thr Ile Ile Thr Ser Leu Asp Thr Cys Asn Gln Phe Ala Cys

AGT GCC ATC ATG ACT GTA ATG AGT GTG GAC AGG TAC TTT GCC CTC GTC CAA CCA TTT CGA  
Ser Ala Ile Met Thr Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Phe Ala Leu Val Gln Pro Phe Arg

CTG ACA CGT TGG AGA ACA AGG TAC AAG ACC ATC CGG ATC AAT TTG GGC CTT TGG GCA GCT  
Leu Thr Arg Trp Arg Thr Arg Tyr Lys Thr Ile Arg Ile Asn Leu Gly Leu Trp Ala Ala

TCC TTT ATC CTG GCA TTG CCT GTC TGG GTC TAC TCG AAG GTC ATC AAA TTT AAA GAC GGT  
Ser Phe Ile Leu Ala Leu Pro Val Trp Val Tyr Ser Lys Val Ile Lys Phe Lys Asp Gly

GTT GAG AGT TGT GCT TTT GAT TTG ACA TCC CCT GAC GAT GTA CTC TGG TAT ACA CTT TAT  
Val Glu Ser Cys Ala Phe Asp Leu Thr Ser Pro Asp Asp Val Leu Trp Tyr Thr Leu Tyr

TTG ACG ATA ACA ACT TTT TTT TTC CCT CTA CCC TTG ATT TTG GTG TGC TAT ATT TTA ATT  
Leu Thr Ile Thr Thr Phe Phe Phe Pro Leu Pro Leu Ile Leu Val Cys Tyr Ile Leu Ile

TTA TGC TAT ACT TGG GAG ATG TAT CAA CAG AAT AAG GAT GCC AGA TGC TGC AAT CCC AGT  
Leu Cys Tyr Thr Trp Glu Met Tyr Gln Gln Asn Lys Asp Ala Arg Cys Cys Asn Pro Ser

GTA CCA AAA CAG AGA GTG ATG AAG TTG ACA AAG ATG GTG CTG GTG CTG GTG GTA GTC TTT  
Val Pro Lys Gln Arg Val Met Lys Leu Thr Lys Met Val Leu Val Leu Val Val Val Phe

ATC CTG AGT GCT GCC CCT TAT CAT GTG ATA CAA CTG GTG AAC TTA CAG ATG GAA CAG CCC  
Ile Leu Ser Ala Ala Pro Tyr His Val Ile Gln Leu Val Asn Leu Gln Met Glu Gln Pro

ACA CTG GCC TTC TAT GTG GGT TAT TAC CTC TCC ATC TGT CTC AGC TAT GCC AGC AGC AGC  
Thr Leu Ala Phe Tyr Val Gly Tyr Tyr Leu Ser Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Ser Ser Ser

ATT AAC CCT TTT CTC TAC ATC CTG CTG AGT GGA AAT TTC CAG AAA CGT CTG CCT CAA ATC  
Ile Asn Pro Phe Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Phe Gln Lys Arg Leu Pro Gln Ile

CAA AGA AGA GCG ACT GAG AAG GAA ATC AAC AAT ATG GGA AAC ACT CTG AAA TCA CAC TTT  
Gln Arg Arg Ala Thr Glu Lys Glu Ile Asn Asn Met Gly Asn Thr Leu Lys Ser His Phe

TAG



図 2

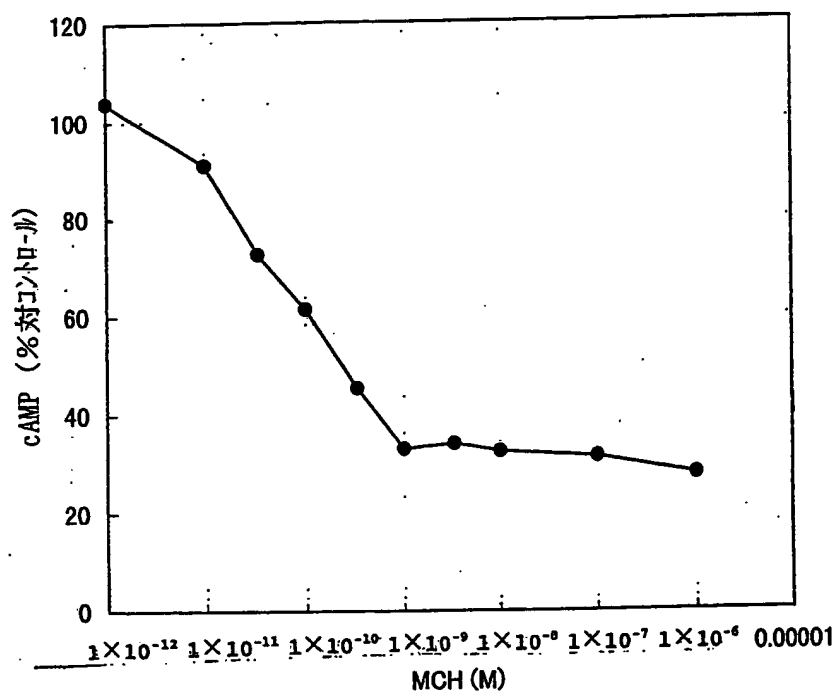


図 3

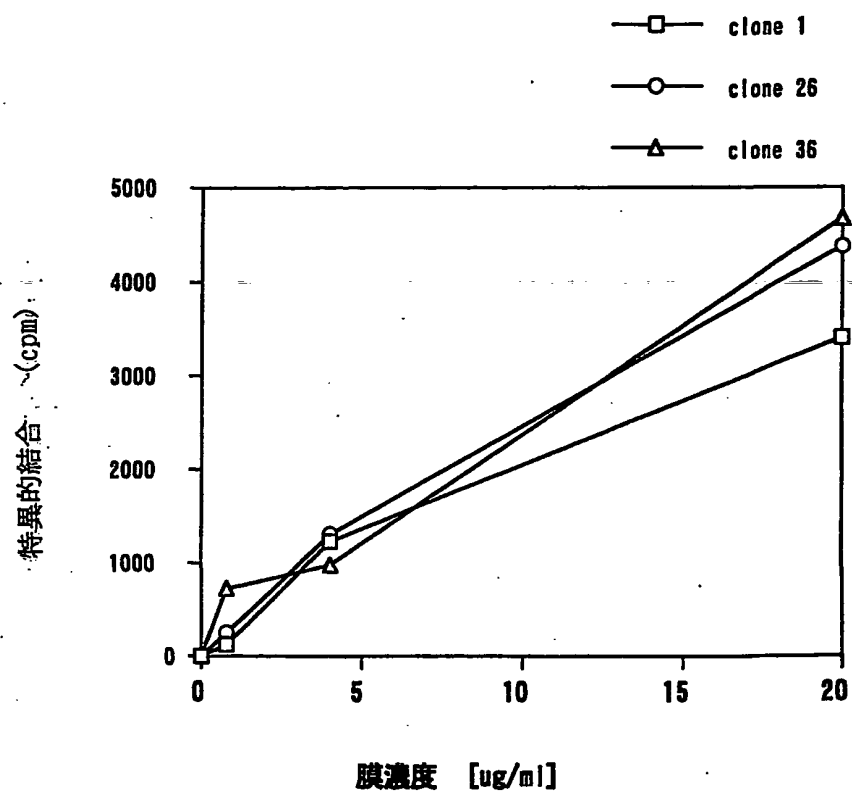


図 4

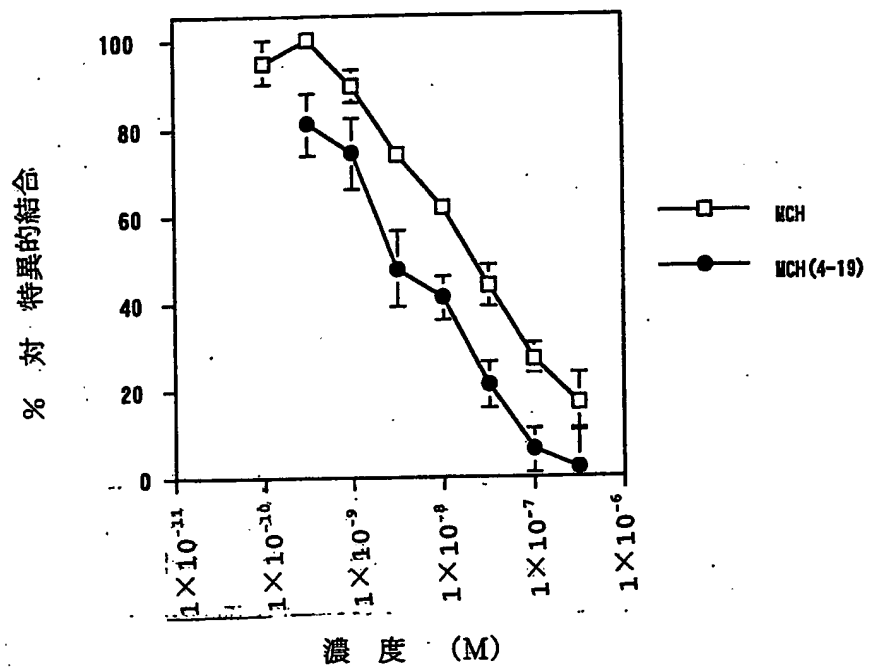
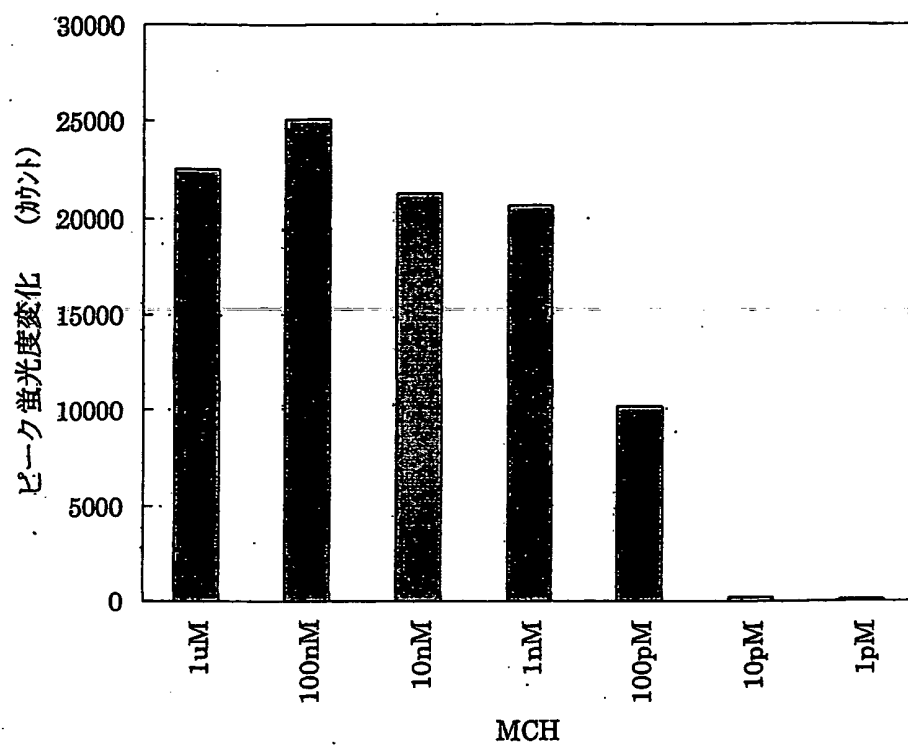
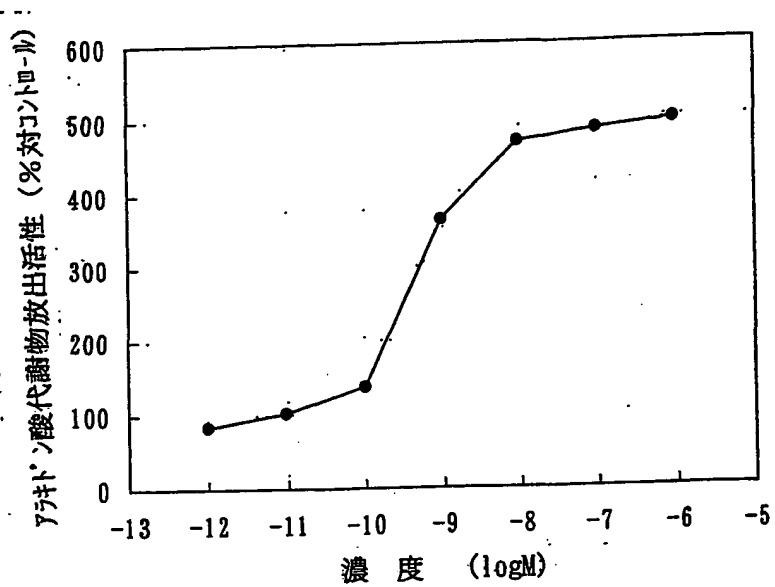


図 5



6/6

図 6



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Screening Method for MCH Receptor antagonist or agonist

<130> 2752W00P

<150> JP 2000-208254

<151> 2000-07-05

<160> 19

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 1

gicgacatga atccatttca tgcac 16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 2

actagtctaa aagtgtgatt tcagag 16

<210> 3

<211> 340

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Met Asn Pro Phe His Ala Ser Cys Trp Asn Thr Ser Ala Glu Leu Leu

2 / 14

	5		10		15
Asn Lys Ser Trp Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Gln Thr Ala Ser Val Val					
	20		25		30
Asp Thr Val Ile Leu Pro Ser Met Ile Gly Ile Ile Cys Ser Thr Gly					
	35		40		45
Leu Val Gly Asn Ile Leu Ile Val Phe Thr Ile Ile Arg Ser Arg Lys					
	50		55		60
Lys Thr Val Pro Asp Ile Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu					
	65		70		75
Val His Ile Val Gly Met Pro Phe Leu Ile His Gln Trp Ala Arg Gly					
	85		90		95
Gly Glu Trp Val Phe Gly Gly Pro Leu Cys Thr Ile Ile Thr Ser Leu					
	100		105		110
Asp Thr Cys Asn Gln Phe Ala Cys Ser Ala Ile Met Thr Val Met Ser					
	115		120		125
Val Asp Arg Tyr Phe Ala Leu Val Gln Pro Phe Arg Leu Thr Arg Trp					
	130		135		140
Arg Thr Arg Tyr Lys Thr Ile Arg Ile Asn Leu Gly Leu Trp Ala Ala					
	145		150		155
Ser Phe Ile Leu Ala Leu Pro Val Trp Val Tyr Ser Lys Val Ile Lys					
	165		170		175
Phe Lys Asp Gly Val Glu Ser Cys Ala Phe Asp Leu Thr Ser Pro Asp					
	180		185		190
Asp Val Leu Trp Tyr Thr Leu Tyr Leu Thr Ile Thr Thr Phe Phe Phe					
	195		200		205
Pro Leu Pro Leu Ile Leu Val Cys Tyr Ile Leu Ile Leu Cys Tyr Thr					
	210		215		220
Trp Glu Met Tyr Gln Gln Asn Lys Asp Ala Arg Cys Cys Asn Pro Ser					
	225		230		235
					240

Val Pro Lys Gln Arg Val Met Lys Leu Thr Lys Met Val Leu Val Leu

245

250

255

Val Val Val Phe Ile Leu Ser Ala Ala Pro Tyr His Val Ile Gln Leu

260

265

270

Val Asn Leu Gln Met Glu Gln Pro Thr Leu Ala Phe Tyr Val Gly Tyr

275

280

285

Tyr Leu Ser Ile Cys Leu Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Ile Asn Pro Phe

290

295

300

Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Asn Phe Gln Lys Arg Leu Pro Gln Ile

305

310

315

320

Gln Arg Arg Ala Thr Glu Lys Glu Ile Asn Asn Met Gly Asn Thr Leu

325

330

335

Lys Ser His Phe

340

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1035

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

gtcgacatga atccattica tgcatttgtt iggaacacct cggccgaact tttaaacaaa 60

tcctggaata aagagtttgc ttatcaaaact gccagtgtgg tagatacagt catcctccct 120

tcctgattg ggattatctg ttcaacaggg ctggttggca acatcctcat tgtattcact 180

ataataagat ccaggaaaaa aacagtcctt gacatctata tctgcaacct ggctgtggct 240

gatttggicc acatagttag aatgcctttt ctatttcacc aatgggcccg agggggagag 300

tgggtgtttg gggggcctct ctgcacatc atcacatccc tggatacttg taaccaattt 360

gcctgtagt ccatcatgac tgtaatgagt gtggacaggt acttggcct cgtccaacca 420

tttcgactga caggttggag aacaaggtac aagaccatcc ggatcaattt gggcctttgg 480

gcagcttctt ttatcctggc attgcctgtc tgggtctact cgaaggatcat caaatitaaa 540

gacggigtgt agagttgtgc ttttgatttg acatccccctg acgatgtact ctggatataa 600



ctttatttga cgataacaac tttttttt cctctaccct tgattttggt gtgctatatt 660  
 ttaattttat gctatacttg ggagatgtat caacagaata aggatgccag atgctgcaat 720  
 cccagtgiac caaaacagag agtgatgaag ttgacaaaga tgggtgctggt gctgggtgta 780  
 gtctttatcc tgagtgcctc cccittatcat gigtalacaac tgggtgaactt acagatggaa 840  
 cagccacac tggccttcta tgggggttat tacctctcca tctgtctcag ctaigccagc 900  
 agcagcatta acccttttct ctacatcctg ctgagtggaa atttccagaa acgtctgctt 960  
 caaatccaaa gaagagcgac tgagaaggaa atcaacaata tgggaaacac tctgaaatca 1020  
 cactttttaga ctagt 1035

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 757

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

caaaagcugg agcuccaccg cgguggcggc cgcucuagcc ccuaaaagug ugaauucaga 60  
 guguuuccca uauungugau uuccuucua gucgucucuc uuuggauuug aggcagacgu 120  
 uucuggaaa uuccacucag caggauugag agaaaagggu uaaugcugcu gcuggcauag 180  
 cugagacaga uggagaggua auaaccaca uagaaggcca gugugggcug uuccaucugu 240  
 aaguucacca guuguauac augauaagg gcagcacuca ggauaaagac uaccaccagc 300  
 accagcacca ucuuugucua cuucaucacu cucuguuuug guacacuggg auugcagcau 360  
 cuggcauccu uauucuguug auacaucucc caaguauagc auaaaaauaa auauagcac 420  
 accaaaauca agggauagagg gaaaaaaaa guuguuauug ucaaaauaaag uguauaccag 480  
 aguacaucgu caggggaugu caaaucaaaa gcacaacucu caacaccguc uuuaauuug 540  
 augaccuucg aguagacca gacaggcaau gccaggauaa aggaagcugc ccaaaggccc 600  
 aaauugauc ggauugucuu guaccuuguu cuccaacgug ucagucgaaa ugguuggacg 660  
 agggcaaaugu accuguccac acucauuaca gucaugaugg cacuacaggc aaauugguua 720  
 caaguaucca gggauugau gauggugcag agaggcc 757

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

<213> Human

<223> The 7th cystein residue binds with the 16th cystein residue to form a intra-molecular disulfide-bond.

<400> 6

Asp Phe Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys

1                      5                      10                      15

Trp Gln Val

19

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

atgaatccat ttcatgcatac ttgt 24

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

ctaaaagtgt gatttcagag tgttt 25

<210> 9

<211> 1023

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

atgaatccat ttcaigcatc ttgttggaa accctcgcg aactttttaa caaatccctg 60  
 aataaagagt ttgcttaica aactgccagt gggtagata cagtcaccti cccttccatg 120  
 attgggatta tctgttcaac agggctgggt ggcaacatcc tcatgtatt cactataata 180  
 agatccagga aaaaaacagt ccttgacatc tatactgca acctggctgt ggctgatttg 240  
 gtccacatag ttggaatgcc tttcttatt caccaatggg cccgaggggg agagtgggtg 300  
 ttgggggggc ctctctgcac catcatcaca tccctggata ctgttaacca atttgcctgt 360  
 agtcccatca tgactgtaat gagtgggac aggtactttg cctctgtcca accatttcca 420  
 ctgacacgtt ggagaacaag gtacaagacc atccggatca atttgggcct ttgggcagct 480  
 tcctttatcc tggcattgcc tgtctgggtc tactcgaagg tcatcaaatt taaagacggt 540  
 gttagagatt gtgcttttga tttagacatc cctgacgatg tactctggta tacactttat 600  
 ttgacgataa caactttttt tttccctcta ccttgattt tgggtgtcta tattttaatt 660  
 ttatgctata ctggggagat gtatcaacag aataaggatg ccagatgtg caatccagt 720  
 gtacaaaac agagagtgt gaagtigaca aagatgggtc tgggtctggt ggtagtctt 780  
 atcttgatg ctgcccctta tcatgtgata caactgggtg acttacagat ggaacagccc 840  
 acactggcct tctatgtggg ttattacctc tccatctgtc tcagctatgc cagcagcagc 900  
 attaacctt tctctacat cctgctgagt ggaaatttcc agaaacgtct gcctcaaate 960  
 caaagaagag cgactgagaa ggaaatcaac aatatgggaa acactctgaa atcacacttt 1020  
 tag 1023

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 6th cystein residue binds with the 15th cystein residue to form  
 a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 10

Phe Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp

1

5

10

15

Gln Val

18

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 5th cystein residue binds with the 14th cystein residue to form  
a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 11

Asp Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln

1 5 10 15

Val

17

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 4th cystein residue binds with the 13th cystein residue to form  
a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 12

Met Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1 5 10 15 16

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 3rd cystein residue binds with the 12th cystein residue to form  
a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 13

Leu Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1 5 10 15

8 / 14

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 2nd cystein residue binds with the 11th cystein residue to form  
a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 14

Arg Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1                      5                      10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> The 1st cystein residue binds with the 10th cystein residue to form  
a intra-molecular disulfide-bond.

&lt;400&gt; 15

Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Arg Pro Cys Trp Gln Val

1                      5                      10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 353

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 16

Met Asp Leu Gln Thr Ser Leu Leu Ser Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn

1                      5                      10                      15

Ile Ser Asp Gly Gln Asp Asn Leu Thr Leu Pro Gly Ser Pro Pro Arg

20.                      25                      30

Thr Gly Ser Val Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly

35                      40                      45

Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Val Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala  
50 55 60  
Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Ser Asn Val Pro Asp Ile  
65 70 75 80  
Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met  
85 90 95  
Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly  
100 105 110  
Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe  
115 120 125  
Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala  
130 135 140  
Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg Lys Pro Ser Met Ala  
145 150 155 160  
Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr  
165 170 175  
Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val  
180 185 190  
Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe  
195 200 205  
Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile  
210 215 220  
Thr Ala Ala Tyr Val Lys Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala  
225 230 235 240  
Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr Lys Arg Val Thr Arg  
245 250 255  
Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr  
260 265 270  
Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser Arg Pro Thr Leu Thr

10 / 14

275                      280                      285  
 Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Ala Asn Ser  
 290                      295                      300  
 Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys Glu Thr Phe Arg Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln Gly Gln Leu Arg Thr  
 325                      330                      335  
 Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg Thr Glu Ser Lys Gly  
 340                      345                      350  
 Thr  
 <210> 17  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 17  
 Met Ser Val Gly Ala Met Lys Lys Gly Val Gly Arg Ala Val Gly Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gln Ala Thr Glu Glu Asp Pro Leu Pro Asn  
 20                      25                      30  
 Cys Gly Ala Cys Ala Pro Gly Gln Gly Gly Arg Arg Trp Arg Leu Pro  
 35                      40                      45  
 Gln Pro Ala Trp Val Glu Gly Ser Ser Ala Arg Leu Trp Glu Gln Ala  
 50                      55                      60  
 Thr Gly Thr Gly Trp Met Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Asn Ala Ser Asn Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala  
 85                      90                      95  
 Gly Ser Pro Pro Arg Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met  
 100                      105                      110

11/ 14

Pro Ser Val Phe Gly Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser  
115 120 125

Thr Val Ile Phe Ala Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn  
130 135 140

Asn Val Pro Asp Ile Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu  
145 150 155 160

Phe Leu Leu Gly Met Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly  
165 170 175

Val Trp His Phe Gly Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp  
180 185 190

Ala Asn Ser Gln Phe Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Ala Ile  
195 200 205

Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg  
210 215 220

Lys Pro Ser Val Ala Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser  
225 230 235 240

Phe Ile Ser Ile Thr Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe  
245 250 255

Pro Gly Gly Ala Val Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr  
260 265 270

Asp Leu Tyr Trp Phe Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu  
275 280 285

Pro Phe Val Val Ile Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg Met  
290 295 300

Thr Ser Ser Val Ala Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr  
305 310 315 320

Lys Arg Val Thr Arg Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val  
325 330 335

Cys Trp Ala Pro Tyr Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser



12/ 14

340                      345                      350  
 Arg Pro Thr Leu Thr Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu  
 355                      360                      365  
 Gly Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys  
 370                      375                      380  
 Glu Thr Phe Arg Lys Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Gln Leu Arg Ala Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg  
 405                      410                      415  
 Thr Glu Ser Lys Gly Thr  
 420

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1074

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 18

gtgcacatgg atctgcaaac ctctgtgtctg tccactggcc ccaatgccag caacatctcc 60  
 gatggccagg ataattctac attgccgggg tcacctcttc gcacagggag tgtctcttac 120  
 atcaacatca ttaigccttc cgtgtttggt accatctgtc tcctgggcat cgtgggaaac 180  
 tccacggtca tccttgtctg gtgaagaag tccaagctac actgggtcag caacgtcccc 240  
 gacatcttca tcatcaacct ctctgtgttg gatctgtctt tcctgttggg catgccttcc 300  
 atgatccacc agctcatggg gaacggcgtc tggcactttg gggaaacat gtgcaccctc 360  
 atcacagcca tggacgcaa cagtcagtcc actagcacct acatcctgac tgccatgacc 420  
 attgaccgct acttggccac cgaccacccc atctcttcca ccaagttccg gaagccctcc 480  
 atggccaccc tggatgtctg cctcctgttg gcgtctctct tcatcagtat caccctgtg 540  
 tggctctacg ccaggctcat tcccttccca ggggtgtctg tgggtgttgg catccgcttg 600  
 ccaaaccggg aacttgacct ctactgttcc actctgtacc agtttttctt ggcctttggc 660  
 ctccgtttg tggtcattac cgccgcatac gtgaaaatac tacagcgcat gacgtcttcg 720  
 gtggccccag cctcccaacg cagcatccgg ctccggacaa agagggtgac ccgcacggcc 780

atigccatct gtciggtctt ctttgtgtgc tgggcacctt actatgigt gcagctgacc 840  
cagcigtcca tcagccgccc gaccttcacg ttigtctact tgtacaacgc ggccatcagc 900  
ttgggctaig ctaacagctg ccigaacccc ttigtgtaca tagtgctctg tgagaccitt 960  
cgaaaacgct tgggtgtgtc agtgaagcct gcagcccagg ggcagctccg cacggtcagc 1020  
aacgctcaga cagctgaiga ggagaggaca gaaagcaaag gcacctgaac tagt 1074

<210> 19

<211> 1275

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

taggtgatgt cagtgggagc catgaagaag ggagtgggga gggcagttgg gcttggaggc 60  
ggcagcggct gccaggctac ggaggaagac ccccttccca actgcggggc ttgcgtccg 120  
ggacaaggct gcaggcgctg gaggtgccc cagccctcgt gggtagggg gagctcagct 180  
cggttgtggg agcaggcgac cggcactggc tggatggacc tggaaagcctc gctgctgccc 240  
actgttccca acgccagcaa caccctgat ggcccagata acctcacttc ggcaggatca 300  
cctcctcgca cggggagcat ctctacatc aacatcatca tgccttcggt gticggcacc 360  
atctgcctcc tgggcatcat cgggaacicc acggtcatct tcgcggctgt gaagaagtc 420  
aagctgcact ggtgcaacaa cgtccccgac atcttcatca tcaacctctc ggtagtagat 480  
ctctctttc tcttgggcat gcccttcatg atccaccagc tcatgggcaa tggggtgtgg 540  
cacttgggg agacatgtg caccctcatc acggccatgg atccaatag tcagttcacc 600  
agcacctaca tctgaccgc catggccatt gaccgctacc tggccactgt ccaccccatc 660  
tcttccacga agttccggaa gccctctgtg gccaccctgg tgatctgctt cctgtgggcc 720  
ctctcttca tcagcatcac cctgtgtgg ctgtatgcca gactcatccc ctctccagga 780  
ggltcagttg gctgcggcat acgctgccc aaccagaca ctgacctta ctggttcacc 840  
ctgtaccagt ttttctggc ctttgccttg cttttgtgg tcatcacagc cgcatactgt 900  
aggatcctgc agcgcatgac gtcctcagtg gccccgcct cccagcgcag catccggctg 960  
cggacaaaga gggtagccg cacagccatc gccatctgtc tggctctctt tgtgtgtcgg 1020  
gcaccttact atgtgtaca gctgaccag ttgtccatca gccgcccagc cctcaccttt 1080  
gtctacttat acaatgcggc catcagcttg ggctatgcca acagctgctt caaccccttt 1140

gigtacatcg tgcicgtga gacgttccgc aaacgttgg tccgtcggg gaagcctgca 1200  
gcccaggggc agcttcgcgc tgcagcaac gtcagacgg ctgacgagga gaggacagaa 1260  
agcaaaggca cctga 1275

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05809

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	WO 01/07606 A1 (SmithKline Beecham PLC), 01 February, 2001 (01.02.01)	1,3,8-11 2-4,12-20
PY	WO 00/49046 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 August, 2000 (24.08.00), & AU 2573900 A	1-4,8-20
PA	WO 00/40725 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 13 July, 2000 (13.07.00), & AU 1802000 A	1-4,8-20
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.261, No.3, (1999), pages 622 to 626	1-4,8-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 September, 2001 (27.09.01)Date of mailing of the international search report  
09 October, 2001 (09.10.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05809

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 5-7  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
The substances included in the compounds which may be obtained using the screening method or the screening kit according to the invention are unclear, and the medicines containing them are also unclear.
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/566, 33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2001年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	WO 01/07606 A1 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 1. 2月. 2001 (01. 02. 01)	1, 3, 8-11 2-4, 12-20
PY	WO 00/49046 A1 (武田薬品工業株式会社) 24. 8月. 2000 (24. 08. 00) &AU 2573900 A	1-4, 8-20
PA	WO 00/40725 A1 (武田薬品工業株式会社) 13. 7月. 2000 (13. 07. 00) &AU 1802000 A	1-4, 8-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 09. 01

国際調査報告の発送日

09.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

印

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, VOL. 261, NO. 3, (1999), p. 622-626	1-4, 8-20

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5-7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
スクリーニング方法またはスクリーニングキットを用いて得られうる化合物には如何なる物質が含まれるのか不明確であり、それを含有する医薬も同様に不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。